



---

# **BACHELORARBEIT**

---

Frau  
**Maria Harthun**

**Untersuchung autosomaler und  
Y-chromosomaler Marker an  
Knochenfunden mit einer  
Liegezeit von 30-50 Jahren**

Mittweida, 2012



## **BACHELORARBEIT**

---

# **Untersuchung autosomaler und Y-chromosomaler Marker an Knochenfunden mit einer Liegezeit von 30-50 Jahren**

Autorin:

**Frau**

**Maria Harthun**

Studiengang:

**Biotechnologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:

**BI09w1-B**

Erstprüfer:

**OA Dr. med. Karlheinz Thiele**

Zweitprüfer:

**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

Einreichung:

**Mittweida, 10. August. 2012**

Verteidigung/Bewertung:

**Mittweida, 2012**



### **Bibliographische Beschreibung:**

Harthun, Maria: *Untersuchung autosomaler und Y-chromosomaler Marker an Knochenfunden mit einer Liegezeit von 30-50 Jahren*. 59 Seiten, 13 Abbildungen.

Hochschule Mittweida (FH), Fakultät Mathematik|Naturwissenschaften|Informatik

Bachelorarbeit, 2012

### **Referat:**

Im Jahr 2002 wurden während Schachtarbeiten auf dem Gelände der Justizvollzugsanstalt Chemnitz menschliche Knochen freigelegt, deren Liegezeit auf 30 bis 50 Jahre geschätzt wurde. Die DNA der Knochen wurde mit der Methodik Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol isoliert und amplifiziert. Mit Hilfe von zwei kommerziellen Multiplex Kits wurde versucht, nahezu vollständige STR-Profile der Knochen zu erstellen. Besonders bei degradiertem DNA sind STR-Systeme, die längere Fragmente enthalten, schwer zu amplifizieren. Die Verwendung der PowerPlex®S5 Systeme sollte hauptsächlich zur Klärung der Zugehörigkeit sowie der Reinheitsbestimmung der Proben dienen. Mit dem Multiplex Investigator Argus Y-12 QS Kit wurden vollständige bzw. nahezu vollständige Y-STR Profile ermittelt. Mit Hilfe von eindeutigen autosomalen PowerPlex®S5 und Y-STR Profilen wurde es möglich, überzählige Einzelknochen den annähernd vollständigen Skeletten zuzuweisen. Die erhaltenen Y-STR-Profile wurden in die Datenbanken der YHRD (<http://www.yhrd.org/>) und ySearch (<http://www.ysearch.org/>) überführt und ausgewertet.

**Title:**

The analysis of autosomal and Y-chromosomal markers of skeletal remains with an idle period of 30-50 years.

**Abstract:**

In 2002, during shaft work on the grounds of the prison Chemnitz, human bones were uncovered. The idle period was estimated of 30 to 50 years. The DNA of bones and teeth were isolated with the phenol/chloroform-isoamylalcohol method and subsequent amplified. With the use of two commercial multiplex kits, it should be possible to create almost complete STR profiles of the biological material. Especially in the case of degraded DNA, the amplification of longer STR systems is difficult. The use of the PowerPlex®S5 systems were primarily used to clarify the affiliation and the purity of the samples. With the multiplex Investigator Argus Y-12 QA kit complete or nearly complete Y-STR profiles were identified. By using unique autosomal PowerPlex®S5 and Y-STR profiles it was possible to assign individual additional bones to nearly complete skeletons. The resulting Y-STR profiles were transferred in the databases of YHRD (<http://www.yhrd.org/>) and ySearch (<http://www.ysearch.org/>) and analyzed.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Leipzig für die tatkräftige Unterstützung. Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn OA Dr. med. Karlheinz Thiele, Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde und Herrn Michael Kohl für die sehr gute Betreuung während meiner Arbeit sowie Frau Simone Schulz, welche das verwendete Knochenmaterial präparierte und die aufgeführten Fotos zur Verfügung stellte. Die Gemeinschaftspraxis für Histopathologie Rabenstein war so freundlich und stellte einen Isolationsplatz zur Verfügung. Herr Dr. rer. nat. Horst Bruchhaus lies mich an seinem Erfahrungsschatz teilhaben und gab hilfreiche Anregungen. Des Weiteren danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit Frau B. Sc. Anne-Marie Pflugbeil. Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, die mir Unterstützung schenkte und ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

Vielen Dank.

*„Inmitten der Schwierigkeiten  
liegt die Möglichkeit!“*

*-Albert Einstein-*





## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Grundlagen .....</b>	<b>1</b>
1.1 Fallbeschreibung .....	1
1.2 Knochen und Knochengewebe .....	2
1.3 Träger der Erbinformation .....	5
1.3.1 Degradation der DNA in Knochengewebe .....	7
1.4 DNA-Polymorphismen .....	10
1.5 Short Tandem Repeats.....	11
1.6 Y-Chromosomen .....	13
1.7 Zielstellung .....	17
<b>2 Material .....</b>	<b>18</b>
2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	18
2.2 Geräte und Software.....	19
2.3 Chemikalien .....	20
2.3.1 Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben .....	20
2.3.2 Quantifizierung der gDNA.....	20
2.3.3 DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol .....	21
2.3.4 Amplifizierung und Fragmentlängenanalyse .....	21
<b>3 Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1 Biologisches Spurenmaterial .....	23
3.2 Aufarbeitung des Knochen- und Zahnmaterials .....	24
3.3 Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben mit anschließender DNA- Extraktion mittels PCI.....	25
3.4 Quantifizierung der gDNA.....	28
3.5 Systeme der Amplifizierung.....	28

3.5.1 PowerPlex®S5 .....	29
3.5.2 Investigator Argus Y-12 .....	29
3.6 Fragmentlängenanalyse mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer .....	30
3.7 Datenbanksuche ySearch und YHRD .....	32
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1 Aufbereitetes Spurenmaterial.....	34
4.2 Profilerstellung mittels der Multiplex-Kits .....	36
4.2.1 Profilerstellung mit dem PowerPlex®S5 Kit .....	36
4.2.2 Profilerstellung mit dem Investigator Argus Y-12 .....	38
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	39
4.3 Ergebnisse der Datenbanksuche ySearch und YHRD .....	44
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>47</b>
5.1 Auswertung Quantifizierungsergebnisse in Hinblick auf die Knochenregion .....	47
5.2 Typisierung der Proben anhand der Elektropherogramme .....	48
5.3 Populationsgenetische Auswertung anhand der verwendeten Datenbanken.....	51
<b>6 Ausblick .....</b>	<b>55</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>58</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>59</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Knochenfundort auf dem Gelände der Justizvollzugsanstalt Chemnitz .....	1
Abbildung 2: Vergleich des Knochenfeinbaus von platten Knochen und langen Knochen [modifiziert nach Tillmann, 2010] .....	3
Abbildung 3: Langer Knochen (Röhrenknochen) [modifiziert nach Tillmann, 2010] .....	4
Abbildung 4: Struktur und Nomenklatur von STRs [modifiziert nach Herrmann, 2007] ....	12
Abbildung 5: Aufbau des Y-Chromosoms und ein Beispiel für die lineare Vererbung [modifiziert nach Butler, 2011] .....	14
Abbildung 6: Knochen und das dazugehörige Knochenfragment nach der Aufarbeitung..	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kapillarelektrophorese [modifiziert nach Gey, 2008 und Butler, 2011] .....	32
Abbildung 8: Vergleich der PowerPlex®S5 STR-Profile zwischen F1-Humerus dexter und F1-Humerus dexter additus .....	37
Abbildung 9: STR-Profil der Zahnprobe F1-OK .....	38
Abbildung 10: Vergleich der PowerPlex®S5 Elektropherogramme von F4-Cranium .....	44
Abbildung 11: Vergleich der Knochenregionen in Bezug auf die DNA-Konzentration.....	48
Abbildung 12: Elektropherogramm F2-Tibia dextra. ....	51
Abbildung 13: Globale Verteilung der Y-Haplogruppen [Jobling, 2003] .....	53

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Häufigste <i>post-mortem</i> -Schäden der DNA und deren Folgen [Wagner, 2007] ....	9
Tabelle 2: Definition der DNA-Tandemwiederholungen (Satelliten-DNA) [Krawczak, 1994].....	11
Tabelle 3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 4: Geräte und Software .....	19
Tabelle 5: Chemikalien zur Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben .....	20
Tabelle 6: Chemikalien zur Quantifizierung von gDNA .....	20
Tabelle 7: Chemikalien für die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol .....	21
Tabelle 8: Chemikalien für die Amplifizierung und Fragmentlängenanalyse von gDNA .....	21
Tabelle 9: STR-Systeme des PowerPlex®S5 .....	22
Tabelle 10: STR-Systeme des Investigator Argus Y-12 .....	22
Tabelle 11: Bestandsaufnahme des biologischen Spurenmaterials .....	24
Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Quantifizierung von gDNA.....	28
Tabelle 13: Gewählte Einstellungen mit der Data Collection Software für PowerPlex®S5 .....	31
Tabelle 14: Gewählte Einstellungen mit der Data Collection Software für Investigator Argus Y-12 .....	31
Tabelle 15: AMOVA-Testung der Proben aufgrund ihrer Haplogruppen .....	33
Tabelle 16: Ergebnisse der Knochenaufbereitung .....	35
Tabelle 17: Mit PowerPlex®S5 Kit ermittelte Allel-Verteilung.....	40
Tabelle 18: Autosomale und Y-chromosomale STR-Systeme der einzelnen Proben.....	41
Tabelle 19: Ergebnistabelle der ySearch für den Haplotyp F1-1.....	45
Tabelle 20: Werte für den Differentialindex $\Phi_{ST}$ .....	46
Tabelle 21: Ergebnisse der AMOVA nach der Sortierung in Haplogruppen. ....	46

## **Abkürzungsverzeichnis**

<b>A</b>	<b>Adenin</b>
<b>aDNA</b>	<b>Ancient DNA (alte DNA)</b>
<b>AMOVA</b>	<b>Analysis of Molecular Variance</b>
<b>bp</b>	<b>Basenpaare</b>
<b>C</b>	<b>Cytosin</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>DDT</b>	<b>Dithiothreitol-Lösung</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethyldinitrilotetraessigsäure</b>
<b>G</b>	<b>Guanin</b>
<b>gDNA</b>	<b>Genomische Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>mb</b>	<b>Megabasenpaare</b>
<b>mtDNA</b>	<b>Mitochondriale Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>MYS</b>	<b>Male-Specific Region des Y-Chromosoms</b>
<b>NaOH</b>	<b>Natriumhydroxid</b>
<b>OK</b>	<b>Oberkiefer</b>
<b>PAR</b>	<b>Pseudoautosomale Region</b>
<b>PCI</b>	<b>Phenol-Chloroform/ Isoamylalkohol</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)</b>
<b>RFLP</b>	<b>Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen</b>
<b>RFU</b>	<b>Relative Fluorescence Units</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>SMM</b>	<b>Single Step Mutation Model</b>
<b>SNP</b>	<b>Single Nucleotide Polymorphism</b>
<b>STR</b>	<b>Short Tandem Repeats</b>
<b>T</b>	<b>Thymin</b>
<b>U</b>	<b>Uracil</b>
<b>UEP</b>	<b>Unique Event Polymorphism</b>
<b>UK</b>	<b>Unterkiefer</b>
<b>UV</b>	<b>Ultraviolett</b>
<b>VNTR</b>	<b>Variable Number of Tandem Repeats</b>
<b>YHRD</b>	<b>Y-chromosome Haplotype Reference Database</b>



## 1 Grundlagen

### 1.1 Fallbeschreibung

Im Jahr 2002 wurden während Schachtarbeiten auf dem Gelände der Justizvollzugsanstalt Chemnitz menschliche Knochen freigelegt (Abbildung 1). Kriminaltechniker der Polizeidirektion Chemnitz sicherten diese. Es ergaben sich vier nahezu vollständig erhaltene humane Skelette, die nach ihren Fundorten zusammengefügt wurden, sowie einzelne Knochenfunde, die nicht direkt zuordnen waren. Aufgrund der Anzahl der gefundenen Schädel und Schädeldächer wurde auf eine Zahl von neun verschiedenen Individuen geschlossen. Die Knochenfunde wurden in Bezug auf die Art der Knochen (menschlich oder tierisch), die Anzahl der Individuen, das Geschlecht, die Körpergröße, das Alter und die Liegezeit sowie auf Zeichen äußerer Gewalteinwirkung betrachtet.



**Abbildung 1: Knochenfundort auf dem Gelände der Justizvollzugsanstalt Chemnitz**

Es wurden an fünf verschiedenen Fundorten auf dem Gelände der Justizvollzugsanstalt Chemnitz vier nahezu vollständige Skelette gefunden sowie Einzelknochen. Anhand der gefundenen Schädel und Schädeldächer lässt sich die Anzahl der Individuen auf neun schätzen.

Die Geschlechtsbestimmung der Skelette fand nach morphognostischen Gesichtspunkten der Beckenknochen statt, wodurch sich die Skelette der männlichen Spezies zuordnen lassen. Das Sterbealter wurde anhand der Oberfläche und Randbezirke der *Facies symphysialis* des Schambeines sowie dem Obliterationsgrad der Schädelnähte ermittelt. Der Zustand des Gebisses konnte ebenfalls Hinweise auf

das Alter geben. Die Körperhöhe wurde durch das Längenmaß der langen Röhrenknochen rekonstruiert. Aufgrund dieser Länge lassen sich mittels verschiedener Formeln Körperhöhen berechnen. Die Liegezeit des Materials wurde anhand der morphologischen Merkmale auf 30 bis 50 Jahre geschätzt, wobei eine längere Leichenliegezeit nicht ausgeschlossen wurde.

### 1.2 Knochen und Knochengewebe

Durch Mumifikations- und Verwesungsprozesse von organischen Geweberesten bilden Knochen, die aufgrund ihrer Materialbeschaffenheit nur sehr schwer abbaubar sind, meist die einzigen Überbleibsel vergangener Zeiten [Herrmann, 2007].

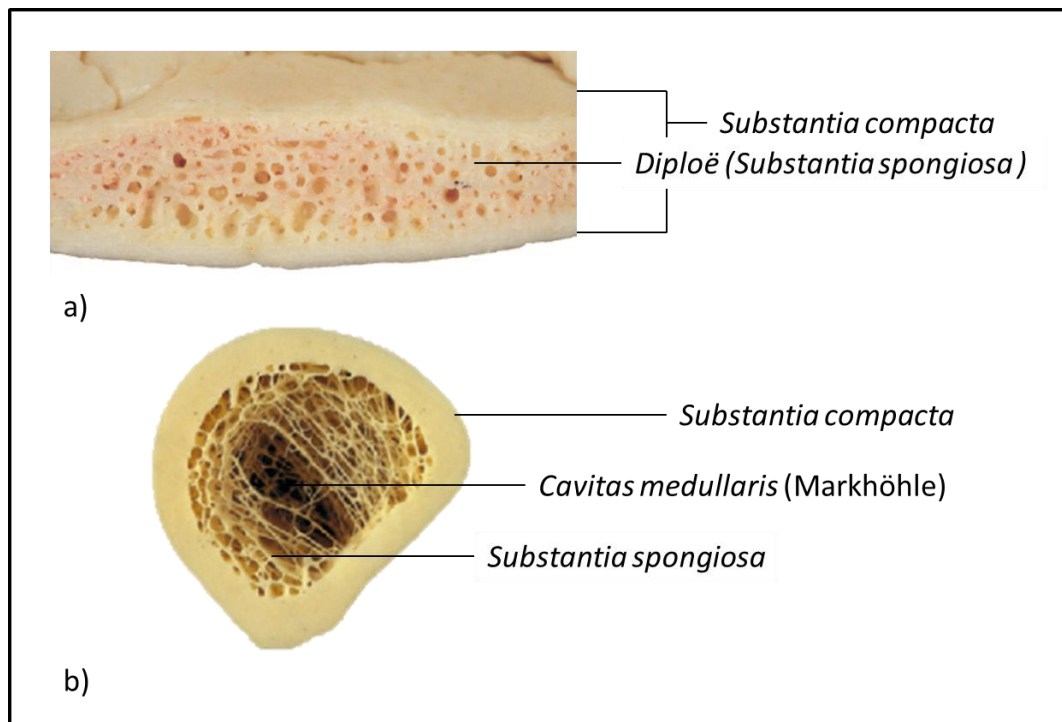
Knochengewebe zählt zu den Binde- und Stützgeweben und zeichnet sich vor allem durch eine hohe Belastbarkeit in Bezug auf die Zug-, Druck-, Biegungs- und Torsionsfestigkeit aus. Dabei entsteht das Knochengewebe während der desmalen Ossifikation direkt aus undifferenzierten Bindegewebszellen, welche sich zu Osteoblasten umbilden, wie im Falle des Schädelknochens oder aber, wie im Falle von Röhrenknochen, aus der chondralen Ossifikation. Im letzteren Fall bildet sich aus einem präformierten Knorpelstück schrittweise Knochengewebe [Appell, 2008].

Das Knochengewebe setzt sich aus einer mineralisierten extrazellulären Matrix sowie knochenbildenden *Osteoblasten*, knochenabbauenden *Osteoklasten* und in der Matrix eingebauten *Osteozyten* zusammen. Kollagenfasern des Typs I, Proteoglycane, spezifische Glycoproteine und zu geringen Teilen auch DNA bilden diese Matrix und werden unter dem Begriff *Osteoid* zusammengefasst. Des Weiteren finden sich im Knochengewebe viele Mineralien wie Phosphat, Magnesium, Natrium, Fluor und zu einem großen Anteil Kalzium, weshalb neben der Stützfunktion die Knochen vor allem als Kalziumspeicher dienen. Auch Wasser findet sich zu einem Viertel in dem Knochengewebe. Dieses ist jedoch an Apatitkristallen zu Hydroxylapatit gebunden. Durch die Anlagerung von Apatitkristallen wird das *Osteoid* an den Kreuzungsstellen der Kollagenfasern mineralisiert und es bildet sich die fertige Knochensubstanz. Diese besteht aus einer kompakten Gewebeschicht, der *Substantia compacta*, die sich in den Rindenschichten des Knochens befindet, und den schwammartigen zarten Knochenbälkchen, der *Substantia spongiosa*, welche im Inneren und an den gelenknahen Bereichen des Knochens zu finden ist.

Aufgrund der an verschiedenen Stellen auftretenden Belastung lassen sich Knochen in lange Knochen (*Ossa longa*), kurze Knochen (*Ossa brevia*), platte Knochen (*Ossa plana*) sowie Knochen mit speziellen Formen unterteilen. So sind Beispiele für einen langen Knochen die Röhrenknochen *Humerus* und *Femur*. Diese umfassen im *Diaphysen*-Bereich die Markhöhle mit der *Substantia compacta*. Jedoch im gelenknahen *Epiphysen*-Bereich zeigt sich, dass sich im Inneren eine mit *Substantia compacta*



überzogene *Substantia spongiosa* befindet. Handwurzelknochen (*Ossa manus*), die zu den kurzen Knochen zählen, bestehen, wie die Röhrenknochen in deren *Epiphysen*-Bereichen, aus einer *Substantia spongiosa*, die ummantelt ist von einer *Substantia compacta*. Platte Knochen wie *Sternum* und *Scapula* sowie Teile des *Craniums* zeigen zwei kompakte Gewebeschichten, zwischen denen eine mehr oder weniger ausgeprägte Schicht der Knochenbälkchen liegt (Abbildung 2) [Witt, 2007; Appell, 2008].



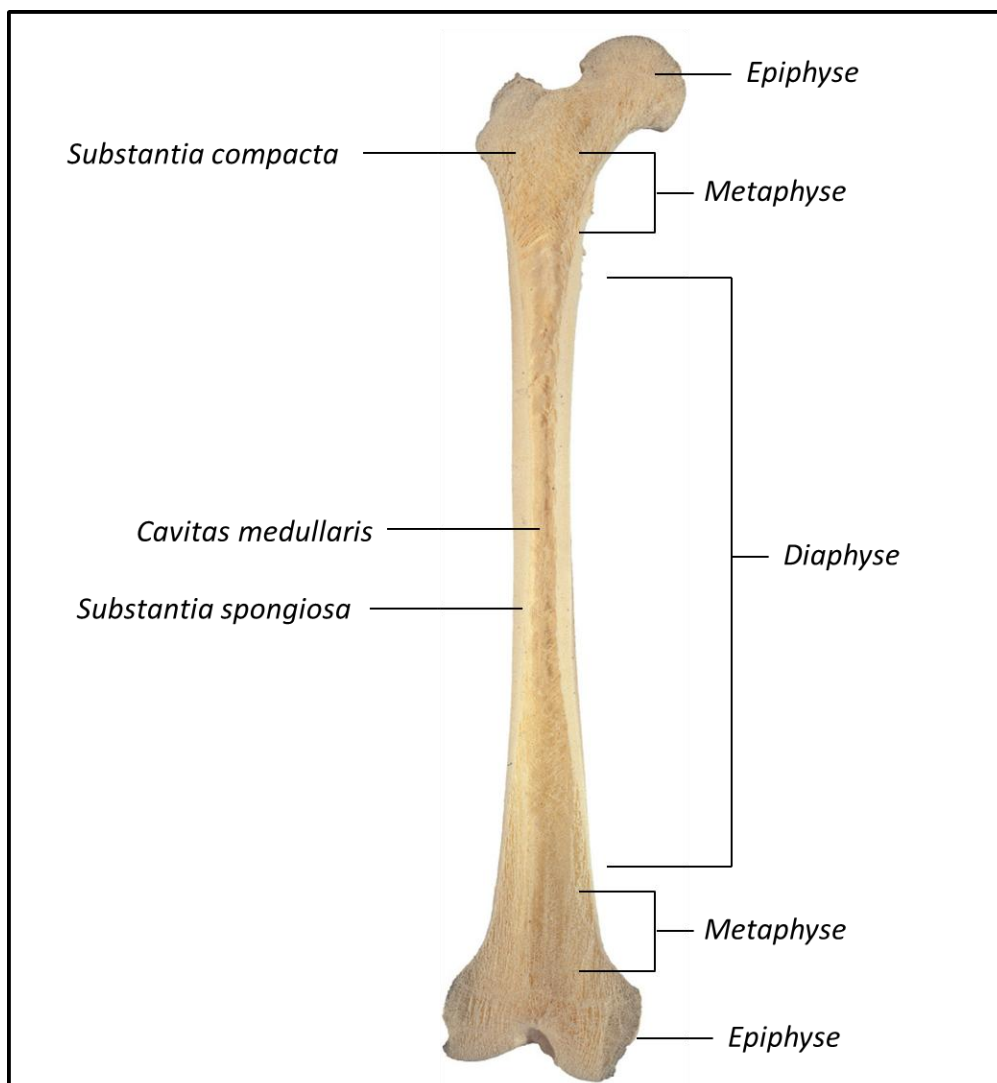
**Abbildung 2: Vergleich des Knochenfeinbaus von platten Knochen und langen Knochen [modifiziert nach Tillmann, 2010]**

Die Abbildung verdeutlicht den Feinbau von a) einem platten Knochen und b) einem langen Knochen im Bereich der *Diaphyse*. Die obere Abbildung a) zeigt den Knochenaufbau eines Fragments aus dem *Cranium*. Es zeigt sich, dass die *Substantia compacta* den Bereich der *Diploë*<sup>1</sup> umschließt. Die untere Abbildung b) zeigt den Querschnitt eines *Femurs* im oberen Drittel des *Diaphysenbereiches*. Es verdeutlicht, wie die *Substantia compacta* die innenliegende Markhöhle umgibt.

Ebenso wie der Feinbau der unterschiedlichen Knochen ist auch die Knochenarchitektur sowohl von der Funktion als auch der Belastung, die auf das Knochengewebe ausgeübt wird, abhängig. Röhrenknochen bestehen aus zwei *Epiphysen*, den Knochenenden. Diese enthalten entweder einen Gelenkkopf oder eine

<sup>1</sup> *Diploë* bezeichnet den Bereich der *Substantia spongiosa* in den Knochen des Schädeldachs [Schiebler, 2005].

Gelenkpfanne. Der im Wachstumsalter knorpelig verbleibende Übergangsbereich zwischen *Epiphyse* und *Diaphyse* wird als *Metaphyse* bezeichnet. Auch hiervon sind zwei Bereiche im Knochen vorhanden. Der Knochenschaft (*Diaphyse*) beschreibt den massiven Anteil des Knochens, bei welchem die *Substantia compacta* die Markhöhle umschließt. In dieser befinden sich bei einem adulten Fettgewebe (gelbes Knochenmark) und bei einem Fetus beziehungsweise Kleinkind blutbildendes Gewebe (rotes Knochenmark). Überzogen ist der komplette Knochen, mit Ausnahme der Gelenkflächen, mit dem *Periost*, der Knochenhaut. Diese besteht aus einer dem knochenzugewandten Cambiumschicht mit sich differenzierenden Osteoblasten und einer dem knochenabgewandten bindegewebigen Schicht (Abbildung 3) [Witt, 2007].



**Abbildung 3: Langer Knochen (Röhrenknochen) [modifiziert nach Tillmann, 2010]**

Die Abbildung stellt einen *Femur* dar, welcher vertikal geteilt wurde. Dargestellt sind auf der linken Seite die einzelnen Bereiche, in die sich ein Röhrenknochen gliedert. Die rechte Seite des Bildes verdeutlicht den Feinbau des Knochens. Im Epiphysen-Bereich sowie in Teilen der Metaphyse finden sich die schwammartigen Knochenbälkchen (*Substantia spongiosa*). Der Diaphysen-Bereich ist

gekennzeichnet durch die *Substantia compacta*, welche die Markhöhle (*Cavitas medullaris*) umschließt.

### 1.3 Träger der Erbinformation

In den 1930er Jahren wurden Proteine als Träger der Erbinformation identifiziert und ihnen wurde die chemische Grundlage der Vererbung zugeordnet. Dieser Trugschluss war eigentlich schon 1920 belegt worden. Denn Frederick Griffith beobachtete Bakterienstämme, die Eigenschaften auf andere Bakterienstämme übertrugen, die ursprünglich andere Eigenschaften besaßen. Aus dieser Beobachtung heraus beruht die Erkenntnis, dass DNA Träger der Erbinformation ist und nicht Proteine [Graw, 2010]. Es sind somit Nukleinsäuren, aus denen der Stoff des Lebens besteht.

Nukleinsäuren sind aus monomeren Untereinheiten aufgebaut. Diese Untereinheiten bezeichnet man als Nukleotide, welche wiederum aus drei chemischen Bausteinen bestehen. Ein Nukleotid besteht aus einer Orthophosphatgruppe, einer spezifischen stickstoffhaltigen heterozyklischen Base und einer Pentose. Mittels der Pentose lassen sich die Nukleinsäuren in zwei Gruppen teilen. Handelt es sich bei dem Zucker um Ribose, so nennt man diese Ribonukleinsäure (RNS oder engl. RNA). Ist jedoch das Nukleotid aus einer Desoxyribose aufgebaut, so liegt Desoxyribonukleinsäure (DNS oder engl. DNA) vor. Beide Formen der Nukleinsäuren enthalten vier stickstoffhaltige Basen, wovon je zwei zu den Purinbasen und zwei zu den Pyrimidinbasen zählen. Sowohl bei der RNA als auch bei der DNA sind die Purinbasen Guanin und Adenin sowie die Pyrimidinbase Cytosin enthalten. Die vierte Base kennzeichnet wieder die einzelnen Formen der Nukleinsäuren. So enthält die DNA die Pyrimidinbase Thymin, jedoch die RNA die Pyrimidinbase Uracil [Buselmaier, 2006]. Diese Veränderung hängt mit den Schutzmechanismen des Genoms zusammen.

Aus chemischen und physikochemischen Daten wurde abgelesen, dass es sich bei den Nukleinsäuren um lange unverzweigte Fadenmoleküle handelt. Die einzelnen Mononukleotide sind dabei über Phosphodiesterbindungen zwischen dem C-3' und C-5' der Pentose zu einem Faden versponnen. Ein DNA-Molekül besteht daher aus zwei gerichteten Polynukleotidsträngen, welche gegenläufige Polarität besitzen und zu einer rechtsläufigen Doppelhelix umeinander gewunden sind [Buselmaier, 2006]. Im Jahre 1951 entdeckte Erwin Chagaff, dass jeweils Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin in äquimolaren Mengen im DNA-Molekül vorliegen. Diese Entdeckung untermauert den Sachverhalt, dass Adenin stets mit Thymin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Cytosin stets mit Guanin unter Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen Basenpaarungen bilden. Aufgrund der Ausbildung unterschiedlicher Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen lässt sich verallgemeinern, dass AT-reichere Regionen weniger Stabilität besitzen als GC-reiche DNA-Abschnitte. Jedoch beruht die Stabilität der Helix nicht allein auf der Ausbildung

von Wasserstoffbrückenbindungen. Eine viel größere Rolle hinsichtlich der Stabilität spielen die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den hydrophoben Seiten, die bei eng aneinanderliegenden Basen auftreten [Buselmaier, 2006; Graw, 2010].

Äußerlich ist die Doppelhelix besonders durch die kleine und große Furche gekennzeichnet. Diese sind vor allem für Interaktionen zwischen DNA und Eiweißmolekülen, welche wiederum bei der Verpackung der DNA in Chromosomen<sup>2</sup> verantwortlich sind, sowie bei der Bindung von regulatorischen Proteinmolekülen von Bedeutung [Graw, 2010].

Die 1950er Jahre zeigten, dass die DNA mittels Denaturierung nicht nur in ihre Einzelstränge zerlegt, sondern auch unter geeigneten Bedingungen renaturiert wird. Bei diesem Schritt verbinden sich die Einzelstränge wieder zu einer Doppelhelix. Mittels der Renaturierungskinetik wurde festgestellt, dass die DNA aus Eukaryoten nicht nur aus Einzelkopiesequenzen, sondern zu einem Großteil aus repetitiven DNA-Sequenzen besteht. Unter dem Begriff repetitive Sequenzen versteht man Teilsequenzen, die nicht nur einmal, sondern mehrfach im haploiden Genom vorliegen. Dieses Phänomen lässt sich anhand spezieller Reaktionsverläufe in der Renaturierungskinetik erklären. Dabei kommt es zu Überlagerungen der Reaktionskurven verschiedener DNA-Fractionen, deren Einzelsequenz mit spezifisch unterschiedlicher Häufigkeit im haploiden Genom auftritt [Graw, 2010].

Der größte Anteil an DNA findet sich im Kern der Zelle. Während der Zellteilung ist die DNA in Form von Chromosomen verpackt und liegt aufgrund des diploiden Chromosomensatzes in nahezu zweifacher Kopie vor. Der jeweils haploide Chromosomensatz wird dabei von Mutter und Vater zufällig an die Filialgeneration (Nachkommen) weitergegeben. Das menschliche Genom besitzt ca. drei Milliarden Basenpaare, von denen mehr als zwei Drittel nicht codierend sind. Dennoch lässt sich in der menschlichen Zelle DNA nicht nur in den Kernen finden. Neben dieser Form existiert auch noch das mitochondriale Genom. Dieses enthält je nach Zelltyp eine unterschiedliche Anzahl an Kopien, die jedoch die des nukleären Genoms deutlich überschreitet, in den Mitochondrien. Die mtDNA unterliegt jedoch einem maternalen Erbgang, sodass an die Filialgeneration ausschließlich das mütterliche Genom weitergegeben wird [Wagner, 2007].

---

<sup>2</sup> Jede Chromatide besteht aus einer einzigen durchgehenden kovalent geschlossenen DNA-Doppelhelix [Graw, 2010].

### 1.3.1 Degradation der DNA in Knochengewebe

Alte DNA, ancient DNA oder auch aDNA bezeichnen ein und denselben Begriff. Im paleogenetischen Kontext umfasst dieser die spurenanalytische und molekulargenetische Charakterisierung von degradierter DNA verstorbener Organismen. Die Analyse von aDNA soll helfen, die genetischen Eigenschaften von Lebewesen zu ergründen. Viele Experimente und Wissenschaftler schufen Meilensteine auf dem Weg der Analyse von alter DNA. So auch die Pionierarbeit von Pääbo (1984, 1985), die gleichzeitig die Tücken der methodischen Technik verdeutlichte. In dieser Arbeit wurde ein DNA-Strang mit einer Länge von 3.400 bp aus einer Mumie, die 2.400 Jahre alt war, isoliert. Aus heutiger Sicht lässt sich darauf schließen, dass es sich bei diesem DNA-Strang um eine Kontamination handeln muss [Wagner, 2007].

Im Laufe der Zeit hat sich gezeigt, dass Knochen und Zahnmaterial weitaus besser für eine DNA-Analyse geeignet sind als Weichteile. Dies beruht auf der Absorption der DNA an das Hydroxylapatit der Knochen und Zähne, welche diese vor einer vollständigen diagenetischen Zersetzung schützt. Weiterhin scheint die Art der Knochen eine entscheidende Rolle in Bezug auf den Erhalt der DNA zu spielen. Es zeigt sich, dass die Knochenmatrix langsamer degradiert als das Knochenmark [Perry, 1988]. Nach den Ergebnissen von McHugh et al. ist anzunehmen, dass kompakte Knochen aufgrund geringer Kontamination von Bakterien und Pilzen für DNA-Analysen besser geeignet sind als Knochen mit einem erhöhten Anteil an *Substantia spongiosa* [McHugh, 2000].

Die Degradierung der DNA ist ein zeitabhängiger Prozess. Günstige Lagerungsbedingungen für das Material sind Trockenheit, Kälte und ein leicht alkalischen pH-Wert von 7,8. So erweist sich frühzeitige Mumifizierung oft als Vorteil für die Erhaltung der DNA, jedoch eine starke Fettwachsbildung eher als Nachteil. Des Weiteren sind Leichen, die nur wenige Jahre im Erdreich lagen, schwerer zu analysieren als Skelette, die Jahrzehnte lang in der Erde gelagert wurden. Man vermutet, dass mit längerer Liegezeit die PCR-Hemmstoffe, welche dafür verantwortlich gemacht werden, abgebaut werden [Dettmeyer, 2011].

Auch die Anzahl der in der Umgebung lebenden Mikroorganismen ist ein entscheidender Faktor bei dem Erhalt von DNA. Daher ist es von Vorteil, wenn sich toxische Metalle in unmittelbarer Nähe des Skelettes befinden, um eine Vermehrung von Mikroorganismen zu unterbinden [Wagner, 2007]. Trotz schützender Matrix von Hydroxylapatit ist der DNA ein Zeitlimit gesetzt. So führt die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen der DNA zu einer Verkürzung des Moleküls, weshalb prähistorische DNA selten Fragmente enthält, die eine Länge von 300 bp überschreiten. Hydrolytische Reaktionen führen des Weiteren zu Modifikationen einzelner Basen. Jedes zehnte bis zwanzigste Cytosin wandelt sich bei stark

degradiert DNA, durch vereinzelte hydrolytische Desaminierung zu Uracil, dem Thyminanalog. Nach der PCR und Sequenzierung wird dieser Sachverhalt durch die Transition von Cytosin zu Thymin sichtbar. In der fortschreitenden Fragmentierung, welche im Laufe der Zeit zum fast vollständigen Abbau der DNA führt sowie den oxidativen Prozess, welcher die DNA zerstören bzw. chemisch modifizieren können, liegt die Schwierigkeit, durch aDNA reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Tabelle 1) [Wagner, 2007]. Diese Verkürzung der Fragmente zieht vor allem Probleme bei der Amplifizierung nach sich. Gewählte Primer können nicht mehr an die template DNA binden, wodurch es zu keinem geeigneten Ergebnis nach der (Multiplex-)PCR kommt. Betroffen von diesen Ausfällen sind vor allem lange Fragmente, wie zum Beispiel die STR-Systeme D18S51 und FGA. An diesen Positionen kommt es häufig zu *Drop-out* Situation, weshalb eine Veränderung der Amplifikationsparameter notwendig ist [Butler, 2011].

**Tabelle 1: Häufigste *post-mortem*-Schäden der DNA und deren Folgen [Wagner, 2007]**

Die Tabelle verweist auf die am häufigsten auftretenden *post-mortem*-Schäden. Die Hauptauslöser für Schäden an der DNA sind hydrolytische und oxidative Prozesse, die zum Strangbruch und PCR-Inhibierung führen.

<b>Art der Modifikation/ Auslöser</b>	<b>Modifikation der DNA-Struktur</b>	<b>Resultat</b>	<b>Folge der Modifikation</b>
Hydrolyse	Spaltung der Phosphodiesterbindungen	Degradierung der DNA	Kurze Fragmente
Hydrolyse	Spaltung N-glycosidischer Bindungen bei Purinen	Depurinierung von Adenin und Guanin	Strangabbruch, Inhibierung der PCR
Hydrolyse	Desaminierung von Cytosin	Uracil	C→T Transition
Hydrolyse	Desaminierung von Adenin	Hypoxanthin	A→G Transition
Hydrolyse	Desaminierung von Guanin	Xanthin	-
Oxidation	Ausbildung einer Hydroxylgruppe am C <sub>8</sub> von Guanin durch Hydroxylradikale	8-Hydroxyguanin	G→T Transversion
Oxidation	Verlust des C <sub>6</sub> und Absättigung der Doppelbindung in Pyrimidinen	Hydantoine	Strangabbruch, Inhibierung der PCR
Oxidation	Verknüpfung zwischen Zucker-Phosphat-Rückrat und Purine	8,5'Cyclopurindesoxiribose	Strangabbruch, Inhibierung der PCR
UV-Strahlung	Dimerbildung zwischen benachbarten Thyminen	Thymindimere	Strangabbruch, Inhibierung der PCR

Aufgrund der hohen Kopiezahl und der damit einhergehenden vergrößerten Chance auf Erfolg wird hauptsächlich die mtDNA-Analyse für prähistorisches Untersuchungsmaterial genutzt. Anthropologische Verwandtschaftsrekonstruktionen stützen sich vor allem auf STR-Analysen bzw. Einzelbasenpolymorphismen (SNP). Die Untersuchungen von Y-chromosomalen Systemen spielen hierfür eine große Rolle.

Lange historische Linien der männlichen Linie können mit diesen Markern verfolgt werden [Wagner, 2007].

### 1.4 DNA-Polymorphismen

In den 1980er Jahren ließen sich mit Hilfe von Restriktionsendonuklease kleine DNA-Variationen, die über das gesamte humane Genom verteilt vorliegen, nachweisen. Man bezeichnete diese als Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP). Diese Art der Individualanalyse ist in der Variationsmöglichkeit der DNA gegenüber der von Proteinpolymorphismen, die bis zu diesem Zeitpunkt genutzt wurden, begründet. Aufgrund des überwiegenden Teils an nicht-kodierenden Bereichen des humanen Genoms herrscht eine hohe Anzahl an Polymorphismen, die ohne Selektionsdruck entstehen. Im Vergleich hierzu Mutationen in Proteinen: diese können sich nur durchsetzen, wenn die Proteinstruktur nicht nachteilig verändert wird. RFLPs lassen sich in zwei Gruppen teilen. Zum einen handelt es sich um die Multi-Locus-Systeme, zum anderen um die Single-Locus-Systeme. Die Single-Locus-Systeme haben sich gegenüber den Multi-Locus-Systemen wegen der Längenpolymorphismen an einem definierten Locus, durchgesetzt. Der Grad an Polymorphismen hat gegenüber den Multi-Locus-Systemen zwar abgenommen, jedoch kann dieser Verlust durch eine entsprechende Erhöhung der Anzahl an zu untersuchenden Systemen ausgeglichen werden [Buselmaier, 2006]. Eine spezielle Weiterentwicklung der Single-Locus-Systeme sind die VNTR-Polymorphismen (variable number of tandem repeat polymorphism). Dieser genetische Polymorphismus beruht auf der interindividuell variierenden Anzahl an Motivwiederholungen. Daher ist die entsprechende Messgröße die absolute Längendifferenz des DNA-Abschnittes eines Chromosoms. Diese ist von Chromosom zu Chromosom unterschiedlich [Krawczak, 1994]. Short Tandem Repeats (STRs) sind noch kürzere VNTRs, deren Motive (Repeats) 1-6 bp lang sind und sich zwischen 10-100fach pro Locus wiederholen. Die Zahl der im humanen Genom vorhandenen STRs beläuft sich auf ca. 100.000, was einem Anteil von 0,2 % bis 0,5 % entspricht. Mit allein 10-16 STR-Systemen lässt sich die Identität eines Individuums schnell und sicher feststellen [Roewer, 2000]. Neben den autosomalen STRs können auch gonosomale und mitochondriale DNA-Polymorphismen betrachtet werden. Diese zeigen in Bezug auf die Vererbungsregeln Besonderheiten. Y-chromosomale DNA-Polymorphismen werden nur in männlicher Linie vererbt, sodass alle männlichen Individuen einer Patrillinie dasselbe Y-chromosomale Profil zeigen. Die mtDNA zeigt dieselbe Vererbungsregelung hinsichtlich der mütterlichen Linie, sodass alle Individuen in der Filialgeneration die mtDNA der Mutter besitzen [Buselmaier, 2006]. Auch X-chromosomale DNA-Polymorphismen zeichnen sich durch Besonderheiten innerhalb der Vererbung aus. Mütter sind Träger zwei verschiedener X-chromosomaler



Haplotypen, von denen zufällig eins an die Filialgeneration vererbt wird. Mögliche Rekombinationen dieser sind aufgrund von meiotischen *crossing-over* möglich. Väter hingegen sind nur Träger eines X-Chromosoms und geben den konstanten X-chromosomalen Haplotyp an alle Töchter weiter. X-STRs haben daher das Potential die Resultate aus einer Analyse von autosomalen und Y-STRs zu unterstützen [Herrmann, 2007].

Fragmentlängenpolymorphismen, die durch die Anzahl der Repeats entstehen, bezeichnet man als Satelliten-DNA. Tabelle 2 beschreibt die Einteilung von Satelliten-DNA.

**Tabelle 2: Definition der DNA-Tandemwiederholungen (Satelliten-DNA) [Krawczak, 1994]**

Einteilung der Satelliten-DNA aufgrund verschiedener Wiederholungsgrade nach Nomenklatur von Tautz.

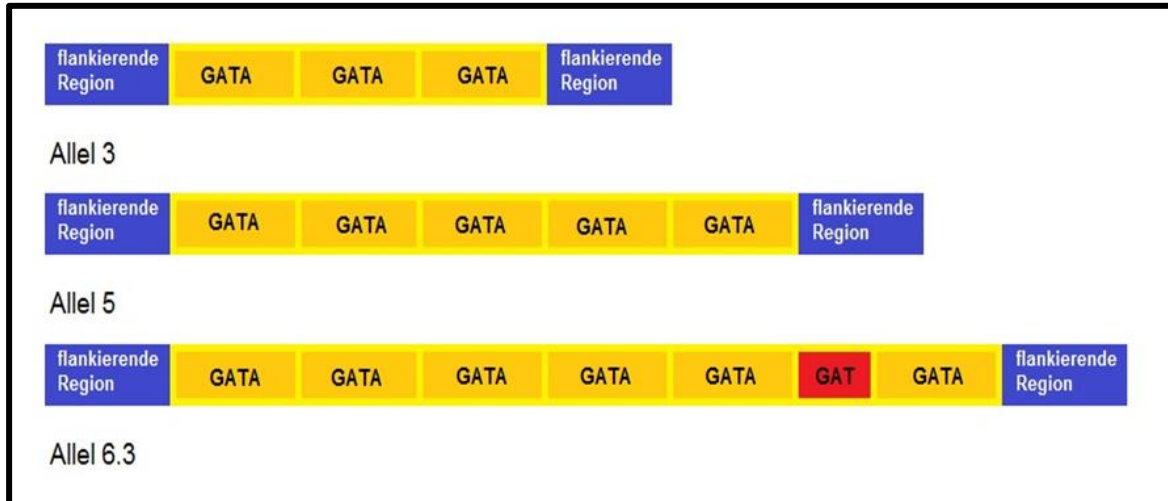
Typ	Wiederholungsgrad pro Locus	Anzahl der Loci	Länge der zu wiederholten Einheiten
Satelliten	$10^3$ - $10^7$	1-2 pro Chromosomen	Ein bis einige tausend bp
Minisatelliten	$10^0$ - $10^3$	Viele Tausend pro Genom	9-100 bp
Mikrosatelliten	$10^0$ - $10^2$	Bis $10^5$ pro Genom, je nach Wiederholungsmotiv	1-6 bp

Eine andere Art von Polymorphismen sind die Single Nucleotide Polymorphism (SNP), wobei es zu einem Einzelbasenaustausch kommt. In diesem Fall ist nicht die absolute Fragmentlänge von Bedeutung, sondern der spezielle Basenaustausch. Der Informationsgehalt eines SNPs liegt zwischen 10 % und 20 % eines STRs, weshalb 50 bis 100 SNPs notwendig sind, um ein Individuum zu identifizieren.

## 1.5 Short Tandem Repeats

In den nicht-kodierenden Bereichen der DNA liegen die Short Tandem Repeats (STRs), welche zur Generierung des genetischen Fingerabdruckes eingesetzt werden. Diese Marker weisen Längenpolymorphismen auf, wodurch sich die Unterscheidung der nachgewiesenen Allele nach der absoluten Länge der STRs richtet. Die Basenabfolge spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. STRs oder auch Mikrosatelliten sind kurze, tandemartig wiederholte Basenabfolgen, die meistens aus zwei bis fünf Nukleotiden bestehen. Die Fragmente liegen in einem Intervall von 100 bis 400 bp, wodurch selbst zum Teil degradierte DNA noch amplifiziert werden kann. In der forensischen DNA-Analyse werden vor allem tetramere Marker eingesetzt, weil diese gegenüber STR-

Systemen mit Di- oder Trinukleotiden den Vorteil geringerer Anfälligkeit für *Stutter*-Artefaktbildung bei der PCR aufweisen. *Stutter-Peaks* entstehen aufgrund von Polymerasefehlern und unterscheiden sich von echten Peaks in Bezug auf deren Höhe. Besonders bei der Unterscheidung von Mischspuren führt dieses Phänomen häufig zu Problemen [Brinkmann, 2004]. STR-Systeme unterliegen einer bestimmten Nomenklatur. Wenn ein STR-System in einem Intron eines Gens liegt, setzt sich der Name des Systems aus dem Namen des Gens und der Nummer des Introns zusammen. Daher findet man das System TH01 im ersten Intron des Tyrosinhydroxylase-Gens. Liegt ein STR-Marker außerhalb eines Gens, gilt für ihn eine andere Nomenklatur. Der erste Buchstabe gibt an, um welchen Marker es sich handelt. Dabei steht „D“ für DNA-Marker. Die darauffolgende Zahl gibt das Chromosom an, auf dem sich der beschriebene Locus des STR-Systems befindet. Der nächste Buchstabe gibt Auskunft darüber, um was es sich bei dem Marker handelt. „S“ steht dabei für *single copy sequence* was bedeutet, es handelt sich um einen Marker, der singulär im Genom vorkommt. Anschließend folgt eine chronologische Nummer [Herrmann, 2007; Brinkmann, 2004]. Die verschiedenen Allele entstehen durch die verschiedene Anzahl der repetitiven Elemente im STR, wodurch es zur Längenänderung kommt. Daher ist die Benennung der Allele abhängig von der Länge des Repeats und erfolgt nach einer bestimmten Regelung (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Struktur und Nomenklatur von STRs [modifiziert nach Herrmann, 2007]**

Struktur und Nomenklatur von STRs am Beispiel einer GATA-Repeatstruktur. Das gelbe Kästchen zeigt die zu wiederholende Einheit, welche aus einem Tetranukleotid besteht. Das STR-System ist von der flankierten Region (blau) eingegrenzt. Die Benennung der Allele erfolgt über den unterschiedlichen Wiederholungsgrad. Das rote Kästchen zeigt ein Zwischenallel, das aufgrund einer Deletion des letzten „A“ entstanden ist. Bei der Benennung des Allels wird der Zusatz „.3“ angegeben.

Die interne Struktur eines STRs ist sehr variabel und kann in fünf Kategorien aufgeteilt werden. Die erste Kategorie beinhaltet einfache Repeatstrukturen, deren wiederholtes

Sequenzmotiv nicht variiert. Dazu gehören zum Beispiel CSF1PO, TPOX, D5S818, D13S317 und D16S539. Zur zweiten Kategorie zählen einfache Repeatstrukturen, die Zwischenallele enthalten. Vertreter dieser Gruppe sind TH01, D18S51 und D7S820. Kategorie drei bilden zusammengesetzte Repeatstrukturen mit Zwischenallelen, zu dieser VWA, FGA, D3S1358 und D8S1179 zählen. Die vierte Kategorie umfasst komplexe Repeatstrukturen, wie zum Beispiel D21S11. Die letzte Kategorie bilden die hypervariablen Repeatstrukturen. Zu ihnen zählt zum Beispiel SE33 [Herrmann, 2007]. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass je höher die Motivzahl ist, desto größer ist die meiotische Instabilität und damit einhergehend die locusspezifische Mutationsrate. Daher liegen die Mutationsraten zwischen 0,01 % und 0,64 % pro Generation. Diese erhöhte Mutabilität wird durch einen für kurze tandem-repeat Sequenzen spezifischen intrahelikalen Mechanismus, dem „*slipped strand mispairing*“, verursacht. Während der Replikation findet in diesem Fall eine Fehlpaarung von Chromatiden statt, die den Verlust oder Zugewinn einzelner Motive bewirkt. Bei perfekten Repeats unterliegt die Allelverteilung annähernd einer Normalverteilung, weshalb Sequenzen mittlerer Länge am häufigsten vorkommen. Auch basenbezogene Mutationsmechanismen führen zu einer Veränderung der Motive. Degenerierte Motive entstehen zum Beispiel aus Punktmutationen oder Deletionen (Abbildung 4).

Zur Identifizierung und Unterscheidung von Personen müssen die ausgewählten STRs einer Vielzahl von Kriterien entsprechen. Dabei müssen die verwendeten STRs hochpolymorph sein und dürfen nicht an Gene oder andere in die Untersuchung einbezogene STRs gekoppelt sein. Das Allel muss unabhängig von anderen Markern sein, da diese zum Teil auf gerichtete Selektionsdrücke wirken. Des Weiteren darf das verwendete STR-System nicht Auslöser einer Krankheit sein. Letztendlich ist die Auswahl des Markers an die chromosomale Lage und seine theoretische und beobachtete Heterozygotenrate gebunden [Herrmann, 2007].

## 1.6 Y-Chromosomen

Das humane Y-Chromosom besitzt in etwa 50 mb und ist aus einem kurzen und einem langen Arm aufgebaut. Ca. 30 mb zählen zum nicht-kodierenden Bereich und bestehen aus hoch repetitiven Sequenzen. Die telomeren Enden des Y-Chromosoms stellen pseudoautosomale Regionen (PAR) dar, die in einem geringen Ausmaß meiotischen *crossing-over* Ereignissen ausgesetzt sind [Herrmann, 2007]. Der Hauptteil des Y-Chromosoms besteht aus einem nicht rekombinanten Bereich, der auch als *male-specific region* des Y-Chromosoms (MSY) bezeichnet wird.

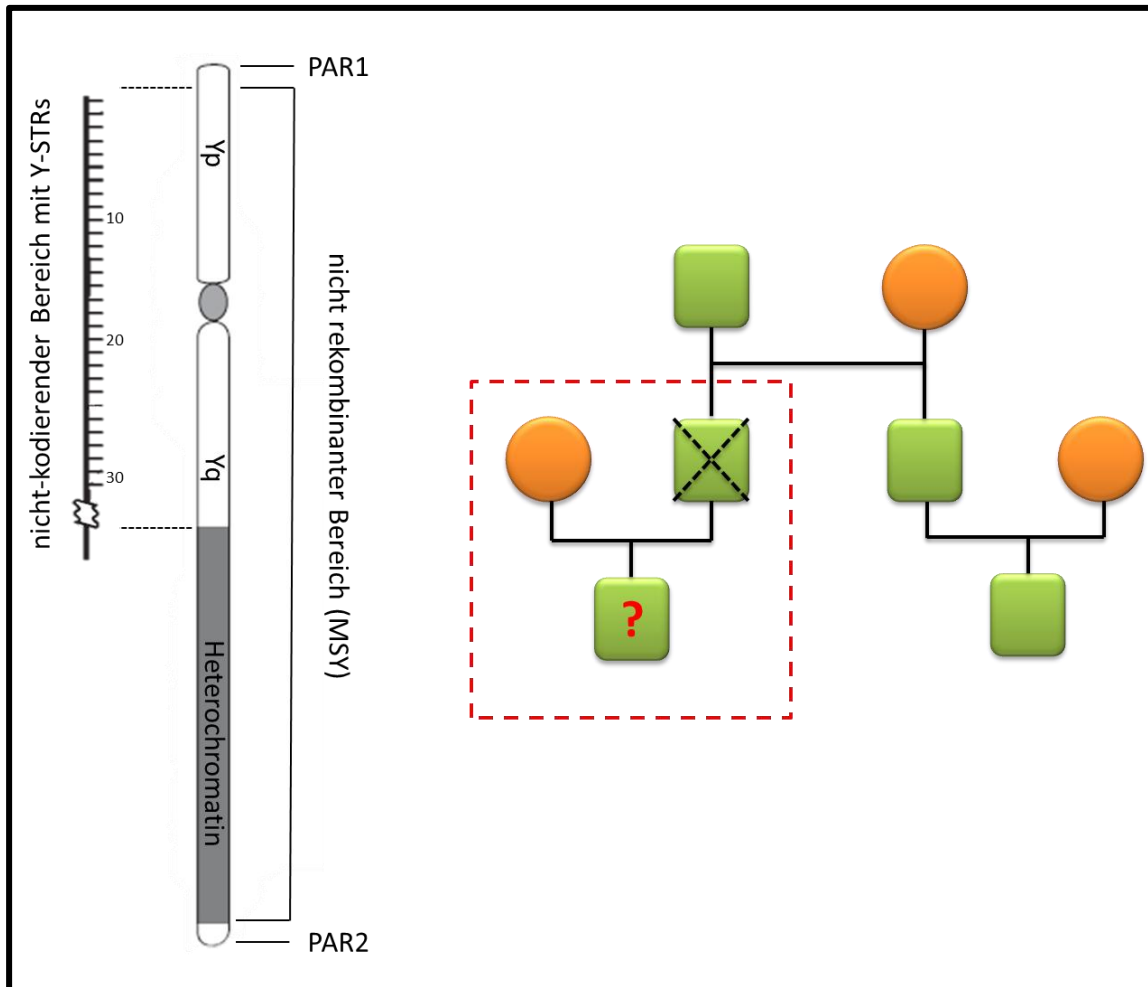


Abbildung 5: Aufbau des Y-Chromosoms und ein Beispiel für die lineare Vererbung [modifiziert nach Butler, 2011]

Auf der linken Seite der Abbildung ist der Aufbau des Y-Chromosoms näher erläutert. Zu sehen sind die zwei pseudoautosomalen Regionen (PAR 1 und PAR 2) sowie der nicht rekombinante Bereich. Dieser wird auch *als male-specific region* des Y-Chromosoms bezeichnet (MSY). Yp bezeichnet den kurzen und Yq den langen Arm des Y-Chromosoms. Des Weiteren teilt sich das Y-Chromosom in den nicht-kodierenden Bereich auf, in dem eine Vielzahl von STRs liegt sowie in den nicht sequenzierten Bereich des Heterochromatins. Die rechte Seite zeigt die lineare Vererbung des Y-Chromosoms. Die männlichen Individuen (grün) besitzen alle denselben Haplotyp. Trotz Fehlens des Vaters (durchgestrichen) könnte in einem Vermisstenfall der Sohn (Fragezeichen) mit Hilfe des Großvaters, Onkels oder Cousins identifiziert werden.

Ein Großteil der auf dem Y-Chromosom lokalisierten Sequenzen liegt ebenfalls dupliziert auf dem X-Chromosom vor. Dabei unterscheidet man drei Klassen an Sequenzen. Zum einen *X-transposed*, zum anderen *X-degenerate* und *ampliconic* Sequenzen. *X-transposed* Sequenzen beschreiben zwei Bereiche auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Diese liegen ebenfalls zu 99 % identisch auf den X-Chromosomen vor, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass dieser Bereich nicht am X-Y *crossing-over* der männlichen Meiose teilnimmt. *X-degenerate* liegen in acht Bereichen

aufgeteilt auf dem ganzen Y-Chromosom vor und besitzen eine 96 % Nukleotidsequenzidentität mit deren X-chromosomalen Homologen. Dieser Sachverhalt wirft Probleme bei der Analyse von Mischspuren auf, die einen hohen Anteil an weiblicher DNA enthalten, da befürchtet werden muss, dass die X-homologen Regionen des Y-Chromosoms auf weibliche DNA schließen lassen. Sieben sehr große Bereiche auf dem Y-Chromosom bilden die *amplificonic*-Segmente. 60 % dieser Sequenzen besitzen eine intrachromosomale Identität von mehr als 99,9 %, was eine Unterscheidung dieser Sequenzen nahezu unmöglich macht. Des Weiteren besteht dieser Sequenzbereich zu großen Teilen aus Palindromen, welche Auswirkungen auf die PCR-Produkte von genetischen Markern haben, die diese Regionen einschließen [Butler, 2011]. Diese Besonderheit muss vor allem bei der Auswahl der Marker berücksichtigt werden.

Genetische Marker des Y-Chromosoms lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Auf der einen Seite klassifizieren Bi-Allele Marker, zu denen SNPs und *Alu*-Elemente zählen, Haplogruppen, während Ergebnisse von Multi-Allele Markern, welche 2 Minisatelliten und eine Vielzahl von STRs auf dem Y-Chromosom beinhalten, als Definition von Haplotypen beschrieben werden. Aufgrund der geringen Mutationsrate von ca.  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  pro Generation werden Bi-Allele Marker häufig als einmaliger Polymorphismus (*engl.* unique event polymorphisms = UEPs) bezeichnet. Mehr als 600 dieser Marker charakterisieren definierte Haplogruppen. Die Mutationsraten der Minisatelliten Loci liegen mit 6 % bis 11 % pro Generation deutlich höher. Nicht ganz so hoch, jedoch höher als die der Bi-Allelen Marker, liegt die Mutationsrate der Y-STRs mit ca. 0,2 % pro Generation [Butler, 2011]. Eine Kombination aus den ermittelten Y-STRs bildet den Haplotyp. Aus diesem Haplotyp können Informationen abgelesen werden, die auf die Herkunft und Verwandtschaft von Y-Chromosomen schließen lassen. Damit einhergehend lässt sich die Identität der Männer bestimmen [Roewer, 2000].

Die auf dem Y-Chromosom liegenden STRs zeigen eine ähnliche Struktur und Variabilität wie autosomale STRs. Daher können Y-STRs ebenfalls für forensische DNA Untersuchungen verwendet werden. Bereits 1985 zeigte Chakraborty, dass Y-chromosomale Systeme gegenüber autosomalen Systemen eine deutlich höhere Effizienz bei der Auswertung von Vaterschaftsgutachten zeigen, obwohl der Informationsgehalt geringer ist, was auf der Tatsache beruht, dass die Mutationsrate geringer ausfällt. Der dennoch enorme Informationsgewinn liegt in der Hemizygotie des Y-Chromosoms begründet. Dies ist auch der Grund, weshalb ein einzelnes Y-chromosomales STR-System, sowohl männliche DNA nachweisen als auch einen Mann von Täterschaft oder Vaterschaft ausschließen kann [Roewer, 2000]. Die am häufigsten verwendeten forensischen Marker sind DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 und DYS 385I/II. Dabei sind DYS389I/II und DYS 385I/II duplizierte Regionen, die mit zwei Allelen typisiert werden können. Das System DYS 385I/II besitzt eine hohe

Variabilität, weshalb es für forensische Individualisierungen diskriminativ ist [Herrmann, 2007; Rolf, 2004].

Y-STRs werden speziell zur Untersuchung von Mischspuren (Sexualdelikte) und paternalen Erbgängen eingesetzt. Bei einem Sexualdelikt können, aufgrund der Vermischung eines sehr hohen Anteils weiblicher DNA mit einem geringen Anteil männlicher DNA, die autosomalen Merkmale des Täters nicht oder nicht sicher identifiziert werden. Die Y-STR-Analyse stellt daher die einzige probate Methode dar, um männliche DNA effizient zu amplifizieren und separat zu analysieren [Rolf, 2004].

Eine Besonderheit des Y-Chromosoms und der darauf lokalisierten Marker ist, dass sie *en bloc* als Haplotyp paternal vererbt werden, das heißt diese werden von Vätern an Söhne weitergegeben. Daher haben alle zur Patrillinie gehörenden Personen die gleichen Y-chromosomalen Merkmale mit Ausnahme der beiden telomer lokalisierten PAR und selten auftretenden Mutationen. Aufgrund dieser Nicht-Individualisierbarkeit ist der biostatistische Aussagewert der Y-STR-Analyse niedriger als der von autosomalen STRs. Jedoch sind Y-STRs von hoher Bedeutung, wenn sie die einzigen verfügbaren DNA-Daten in einem Fall darstellen. Der Y-Haplotyp kann in diesem Fall verwendet werden um Tatverdächtige auszuschließen. Übereinstimmungen sagen hingegen nur aus, dass der Tatverdächtige, dessen Vater oder Bruder oder ein anderer mit gleichem Y-chromosomalen Muster der Spurenverursacher sein könnte [Herrmann, 2007; Rolf, 2004]. Des Weiteren kann aus der Zahl an Y-chromosomalen Allelen nicht unbedingt auf die Zahl der Spurenverursacher geschlossen werden. Die Tendenz zur Akkumulation von repetitiver DNA auf dem Y-Chromosom verursacht eine Häufung von duplizierten oder triplizierten STR-Sequenzen. Dieses Phänomen tritt im Vergleich zu autosomalen Systemen in Y-chromosomalen System recht häufig auf [Roewer, 2000].

Wegen der Variabilität des Haplotyps ist die Bestimmung der Frequenzen und die Einschätzung des Aussagewertes nur über den Zugang zu einer großen Datenbank möglich. Die größte Datenbank ist die **Y-chromosome Haplotype Reference Database** (<http://www.yhrd.org/>). Auf der Grundlage von stetig aktualisiertem Datenmaterial ist eine online Frequenzabfrage möglich. Des Weiteren kann mit Hilfe der Datenbank auf die ethnische Abstammung des Spurenverursachers geschlossen werden [Herrmann, 2007; Rolf, 2004]. Diese Populationsabhängigkeit der durch STRs definierten Haplotypen, lässt sich aus der linearen rekombinationsfreien Vererbung des Y-Chromosoms schließen. Wichtigste Ursache hierfür ist der genetische Drift. Diese nimmt, durch die ein Viertel Situation des Y-Chromosoms gegenüber eines jeden Autosomen, deutlich mehr Einfluss. So bestärken nicht nur Gründereffekte, Migration und Isolation eine Differenzierung der Y-chromosomalen Haplotypfrequenzen, sondern auch die Anzahl der von einem Vater gezeugten Söhne, Heirats- und Erbfolgeregel, Promiskuität und Religion sowie das Phänomen der Patrillokalität beeinflussen die Verteilung des Y-Chromosoms. Bei der Bewertung der Resultate muss beachtet

werden, dass identische Haplotypen nicht gleichzeitig auf gemeinsame Abstammung schließen. Durch Mutationen, die auch in Y-chromosomalen Systemen auftreten können, können Haplotypen nicht gemeinsamer Abstammung angeglichen werden. Als rekurrente Mutationen bezeichnet man Mutationen, die Haplotypen nicht weiter differenzieren. Stattdessen sind die Haplotypen durch Hin- und Rückmutationen, die eine Addition mit anschließender Subtraktion nach sich ziehen, ununterscheidbar. Die Mutationsrate von  $3 \cdot 10^{-3}$  pro Locus und Chromosom hat über die Jahrtausende hinweg bewirkt, dass viele Y-STR-Haplotypen rekurrent mutiert sind und damit eine gemeinsame Abstammung vortäuschen [Roewer, 2000].

### 1.7 Zielstellung

Ziel der Arbeit ist es, aus den Knochenproben chromosomale DNA mit der Methodik Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol zu isolieren und die erhaltene DNA zu amplifizieren. Die Extraktionsmethode mit Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol wird vor allem bei stark degradiertem Material verwendet, um möglichst viel DNA zu erhalten. Mit Hilfe von zwei kommerziellen Multiplex Kits wird versucht, nahezu vollständige STR-Profile der Knochen zu erstellen. Besonders bei degradierter DNA sind STR-Systeme, die längere Fragmente enthalten, schwer zu amplifizieren. Die Verwendung der PowerPlex®S5 Systeme soll hauptsächlich zur Klärung der Zugehörigkeit sowie der Reinheitsbestimmung der Proben dienen. Mit dem Multiplex Investigator Argus Y-12 QS Kit werden vollständige bzw. nahezu vollständige Y-STR Profile erhofft. Mit Hilfe von eindeutigen Y-STR Profilen wird es möglich, zuvor nicht zuordenbare Einzelknochen den annähernd vollständigen Skeletten zuzuweisen. Kommt es zur Übereinstimmung von Proben im Y-STR-Profil bei unterschiedlichen PowerPlex®S5 Profilen, lässt sich eine Verwandtschaft der Individuen nicht ausschließen. Des Weiteren wurde versucht, mit Hilfe von Datenbanken, wie der YHRD (<http://www.yhrd.org/>) die Nationalität bzw. der ySearch (<http://www.ysearch.org/>) die Haplogruppe der Skelettreste zu ermitteln.

## **2 Material**

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien aufgezählt. Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden dabei zusammengefasst. Verwendete Chemikalien wurden hingegen den einzelnen Arbeitsschritten zugeordnet.

### **2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

**Tabelle 3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

Die Tabelle führt die verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Reaktionsgefäße	Falcon™ 50 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL Tubes	eppendorf
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips 10 µL, 100 µL und 1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen	Top-Line® Filter-Tips 10 µL, 100 µL und 1000 µL	AHN Biotechnologie
Pipettenspitzen	Dualfilter 10 µL, 100 µL und 1000 µL	eppendorf
FilterMembranen	Membrane Filters 0,05 µm VMWP	Millipore
Rundschalen	Petri Dishes Ø47mm	Millipore
Glaswaren	Schottflaschen 100 mL, 250 mL, 500 mL und 1000 mL	SCHOTT DURAN
	Messbecher 50 mL, 250 mL	SIMAX



## 2.2 Geräte und Software

**Tabelle 4: Geräte und Software**

Aufgeführt werden die verwendeten Gerätschaften sowie genutzte Software.

<b>Gerät</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Hartschnittmikrotom	Polycut S	Reichert-Jung
Zahn- und Knochenmühle	MM200	Retsch
UV-Bank	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Kisker
UV-Lampe	TA 150	Solidmed-Quarzlampen
Feinwaage	CP224 S	Sartorius
Pipetten	Eppendorf Research 2,5 µL, 10 µL, 200 µL und 1000 µL	eppendorf
Rotor	neo-Lab-Rotator 2-1175	neo-Lab
Zentrifuge	Universal 320	Hettich
Vortex	lab dancer	vario
Wasserbad mit Schüttelfunktion	Sw22	Julabo
Autoklav	Autoklav 23	MELAG
Tischzentrifuge	centrifuge 5434	eppendorf
Vakuumzentrifuge	concentrator 5301	eppendorf
Brutschrank	Thermo SCIENTIFIC	HERAEUS oven
Thermocycler	GeneAmp®PCR System 9700	Applied Biosystems
Thermoblock	TRIO-Thermoblock	biometra
Sequenzier	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Gerätesoftware	Data Collection Software	Applied Biosystems
	310 User Software	Applied Biosystems

## 2.3 Chemikalien

### 2.3.1 Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben

**Tabelle 5: Chemikalien zur Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben**

Die Tabelle zählt die verwendeten Chemikalien für den Schritt der Dekalzifizierung auf.

Lösung	Bestandteile	Firma
0,5 M	Triplex III	MERCK
Ethylendinitrilotetra- essigsäure (EDTA) (pH 7,5)	Natriumhydroxid (NaOH) Pellets	MERCK
	Aqua dest.	B. Braun
0,5 M EDTA (pH 7,8)	Triplex III	MERCK
	NaOH Blättchen	MERCK
	Aqua dest.	B. Braun
All-tissue DNA-Kit		GEN-IAL
QIAmp® DNA mini Kit		QIAGEN
Dithiothreitol (DTT)		SERVA
Proteinase K (c = 20mg/ mL)	30m Anson-U/mg, EC 3.4.21.14	MERCK
	Aqua dest.	B. Braun

### 2.3.2 Quantifizierung der gDNA

**Tabelle 6: Chemikalien zur Quantifizierung von gDNA**

Kit für die Konzentrationsbestimmung von humaner gDNA.

Lösung	Bestandteile	Firma
Quantifiler® Human DNA Quantification Kit		Applied Biosystems

### 2.3.3 DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol

**Tabelle 7: Chemikalien für die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol**

Aufgeführt werden Chemikalien, welche für eine erfolgreiche DNA-Extraktion mit der Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol Methode nötig sind.

<b>Lösung</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Firma</b>
Ethanol abs.		J.T. Baker
Aqua dest.		B. Braun
Roti® Phenol		ROTH
Chloroform		MERCK
Isoamylalkohol		MERCK
Natriumchlorid (NaCl)		KMF optiChem
TE-Puffer (AE-Elution Buffer)		QIAGEN
TN-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	SERVA
	Salzsäure	J.T. Baker
	Natriumchlorid	KMF optiChem
	Aqua dest.	B. Braun

### 2.3.4 Amplifizierung und Fragmentlängenanalyse

**Tabelle 8: Chemikalien für die Amplifizierung und Fragmentlängenanalyse von gDNA**

Für die Amplifizierung und die Fragmentlängenanalyse wurden zum einen das PowerPlex®S5 System Kit, Promega und zum anderen das Investigator Y-12 QS Kit PCR Assay, QIAGEN verwendet.

<b>Lösung</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Firma</b>
PowerPlex®S5 System		Promega
Investigator Argus Y-12 QS Kit PCR Assay		QIAGEN
Hi-Di™ Formamid		Applied Biosystems

### 2.3.4.1 Verwendete STR-Systeme des PowerPlex®S5

Dieses kommerziell erhältliche Kit beinhaltet vier autosomale STR-Systeme sowie das geschlechtsspezifische System Amelogenin.

**Tabelle 9: STR-Systeme des PowerPlex®S5**

Aufgeführt sind die einzelnen verwendeten Systeme dieses Kits. Es wird der Name, die Repeat Struktur sowie die Mutationsrate des einzelnen Systems angegeben. Die einzelnen Werte wurden aus der STR-Base entnommen. Wobei die Repeat Struktur nach dem GeneBank top strand nachgebildet ist.

System	Repeat Struktur	Mutationsrate
Amelogenin	Die Fragmentlänge des X-Chromosoms ist kürzer als die des Y-Chromosoms. Dem X-Chromosom fehlt eine 6-stellige Basenabfolge [AAAGTG] innerhalb des Fragments.	-
D18S51	[GAAA] <sub>n</sub>	0,22 %
D8S1179	[TCTA] <sub>n</sub>	0,14 %
TH01	[TCAT] <sub>n</sub>	0,01 %
FGA	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTTCT[CTTT] <sub>n</sub> CTCC[TTCC] <sub>2</sub>	0,28 %

### 2.3.4.2 Verwendete STR-Systeme des Investigator Argus Y-12

Dieses kommerziell erhältliche Kit enthält 11 chromosomale STR-Systeme, welche auf den Y-Chromosomen lokalisiert sind. Die aufgeführte Tabelle beschreibt die verwendeten Systeme genauer.

**Tabelle 10: STR-Systeme des Investigator Argus Y-12**

Aufgeführt sind die einzelnen verwendeten Systeme dieses Kits. Es wird der Name, die Repeat Struktur sowie Allel Range und die Mutationsrate des einzelnen Systems angegeben. Die einzelnen Werte wurden aus dem Benutzerhandbuch bzw. der STR-Base entnommen.

System	Repeat Struktur	Allel Range	Mutationsrate
DYS439	[GATA] <sub>n</sub>	5-19	0,61 %
DYS437	[TCTA] <sub>n</sub> [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>4</sub>	4, 8-18	0,13 %
DYS390	[TCTG] <sub>n</sub> [TCTA] <sub>m</sub> [TCTG] <sub>p</sub> [TCTA] <sub>q</sub>	12, 17-29	0,25 %
DYS385	[GAAA] <sub>n</sub>	6-28	0,21 %
DYS391	[TCTA] <sub>n</sub>	5-16	0,28 %
DYS389-I	[TCTG] <sub>q</sub> [TCTA] <sub>r</sub>	8-17	0,24 %
DYS19	[TAGA] <sub>3</sub> TAGG[TAGA] <sub>n</sub>	9-19	0,25 %
DYS389-II	[TCTG] <sub>n</sub> [TCTA] <sub>p</sub> [TCTG] <sub>q</sub> [TCTA] <sub>r</sub>	23-35	0,35 %
DYS393	[AGAT] <sub>n</sub>	7-18	0,08 %
DYS438	[TTTTTC] <sub>n</sub>	7-18	0,07 %
DYS392	[TAT] <sub>n</sub>	4-20	0,07 %

### **3 Methoden**

#### **3.1 Biologisches Spurenmaterial**

Das Untersuchungsmaterial, welches am Fundort sichergestellt wurde, umfasste *craniale* und *postcraniale* Skelettfragmente sowie hinreichend gut erhaltenes Zahnmaterial. Aus den einzelnen Knochen wurden Proben von *Cranium*, *Femur*, *Tibia* und *Humerus* entnommen. Die totale Anzahl des Probenmaterials beträgt 22 Knochenfragmente und 19 Zähne. Das Zahnmaterial wurde, aufgrund der entstandenen geringen Menge an Zahnmehl, zu sieben Proben zusammengefügt, um so eine größere DNA-Ausbeute zu erhalten. Beim Zusammenfassen der Zähne wurde eine strikte zeitliche und räumliche Trennung der Proben eingehalten, um Kontaminationsquellen zu vermeiden. Des Weiteren wurden ausschließlich Zähne aus ein und demselben Kiefer zusammengefasst. Lose Zähne wurden, trotz geringer Menge, nicht zusammengefügt, da eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.

**Tabelle 11: Bestandsaufnahme des biologischen Spurenmaterials**

Die erste Spalte beschreibt die Fundorte, die von 1-5 gekennzeichnet wurden. In Spalte zwei werden die Bereiche der Probenfragmente beschrieben, wobei das dazugehörige Gewicht der Fragmente in Spalte 3 angegeben ist. Als Beispiel: Das ursprünglich verwendete Knochenfragment aus dem Humerus dexter von Fund 1 betrug 9 g. Analog ist in den Spalten 4 und 5 das Zahnmaterial aufgetragen, getrennt nach Fundort sowie Unterkiefer (UK) und Oberkiefer (OK).

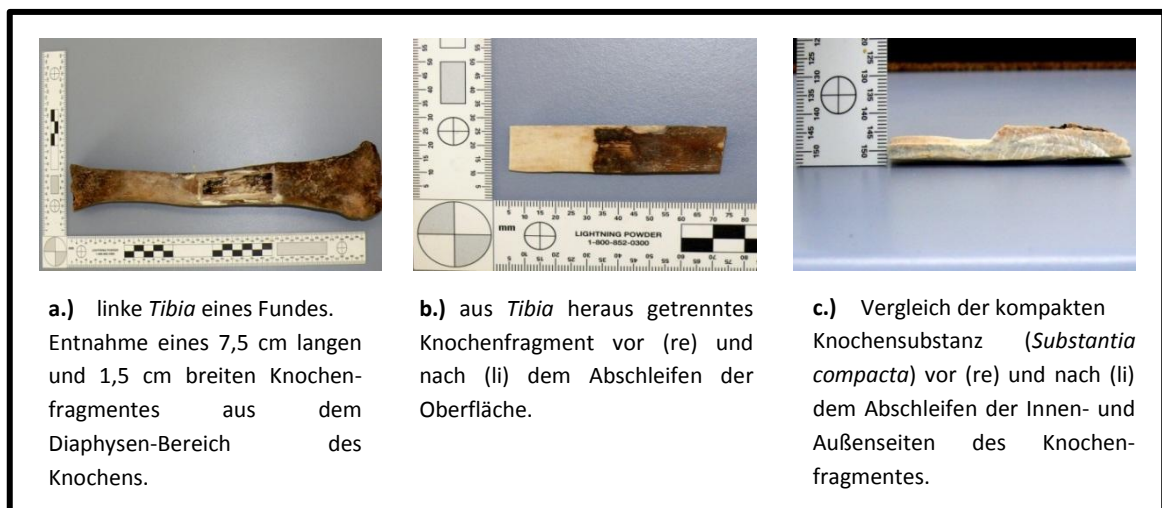
<b>Fund</b>	<b>Knochenmaterial</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>Zahnmaterial</b>	<b>Menge [g]</b>
1	Calvaria	9	OK: 13	0,67
	Humerus dexter	9		
	Humerus dexter additus	6,5		
	Femur dexter	20,05		
	Femur sinister additus	10,48		
	Femur sinister	7,24		
	Tibia dextra	5		
2	Calvaria	12	OK:14,15,27	3,498
	Humerus dexter	10	UK: 45,35,44	-
	Femur dexter	14,89		
	Corpus Tibiae sinistrae additus	5		
	Tibia sinistra	13,74		
	Tibia dextra	2,65		
3	Calvaria	9		
	Humerus sinister	8		
	Femur dexter	15,9		
	Tibia sinistra	12		
4	Cranium	-	OK: 13,11,21	2,68
	Humerus sinister	6	UK: 47,43,38	3,39
	Femur sinister	8		
	Tibia sinistra	6		
	Tibia dextra additus	9		
5	∅		OK: 18,17,28	5,64
			UK: 43,44,45	2,95

### 3.2 Aufarbeitung des Knochen- und Zahnmaterials

Die ausgewählten Knochen und Zähne wurden gründlich gereinigt und von Fremd-DNA befreit. Dafür wurden Knochenfragmente herausgeschnitten und oberflächlich abgeschliffen (Abbildung 6). Diese erste mechanische Aufbereitung ist bei sehr lange gelagertem Knochenmaterial essentiell, da so bereits Verunreinigungen durch Fremd-

DNA entfernt werden. Anschließend wurden die Knochenfragmente mit 99 % Ethanol und UV-Bestrahlung behandelt. Durch die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wurde die Struktur von Fremd-DNA, die sich auf der Oberfläche des Knochens befindet, so verändert, dass diese nicht mehr amplifizierbar ist.

Die Knochenfragmente wurden mit einem Hartschnittmikrotom zu Knochenmehl verarbeitet. Mit dieser maschinellen Aufbereitung findet eine Vergrößerung der Probenoberfläche und damit einhergehend eine Vergrößerung der Angriffsfläche für die anschließende Dekalzifizierung statt. Die Schnittdicke des Mikrotoms lag dabei zwischen 2  $\mu\text{m}$  und 20  $\mu\text{m}$ . Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Knochen und des verschieden ausgeprägten Grades der Verwesung, war es bei einigen Fragmenten nur bedingt möglich Knochenmehl mittels eines Mikrotoms herzustellen. In diesen speziellen Fällen wurde auf eine Knochen- und Zahnmühle zurückgegriffen. Mit einer Frequenz von 30/sek wurde das einzelne Fragment 30 Sekunden lang bearbeitet. Anschließend wurde der Mahlvorgang für 30sek unterbrochen. Diese Pause ist notwendig, um ein zu starkes Erhitzen und damit die Zerstörung der Probe zu vermeiden.



**Abbildung 6: Knochen und das dazugehörige Knochenfragment nach der Aufarbeitung.**

In a.) ist der Knochen dargestellt, aus dessen Diaphysen-Bereich ein 7,5 cm langes und 1,5 cm breites Fragment heraus getrennt wurde. Die darauf folgende Abbildung b.) zeigt das heraus getrennte Knochenfragment. Abbildung c.) bildet erneut das heraus getrennte Knochenfragment ab. Dabei zeigt die linke Seite das unbehandelte und die rechte Seite das behandelte Fragment.

### 3.3 Dekalzifizierung der Knochen- und Zahnproben mit anschließender DNA-Extraktion mittels PCI

Das durch die mechanische Aufarbeitung entstandene Knochenmehl wurde mit Hilfe von Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) entkalkt, mit dem A/I-tissue DNA Kit von

GEN-IAL aufbereitet und die enthaltene DNA mit Phenol-Chloroform/ Isoamylalkohol isoliert.

Im ersten Teil wurde das entstandene Knochenmehl drei Tage lang mit einer 0,5M EDTA-Lösung behandelt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mittels 10 M NaOH-Lösung auf 7,5 eingestellt. Dabei wurde das Knochenmehl am ersten Tag vormittags mit 40 mL EDTA überschichtet und mit Hilfe eines Rotors bei 4 °C ca. 6 h inkubiert. Anschließend wurde das EDTA gewechselt. Hierfür wurde das Knochenmehl-EDTA-Gemisch bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin erneut mit 40 mL EDTA übergossen und aufgeschüttelt, so dass ein homogenes Gemisch entstand. Dieses wurde anschließend über Nacht wieder bei 4 °C und permanenter Rotation inkubiert. Am zweiten Tag, sowie am Vormittag des dritten Tages, wurde dieser Schritt wiederholt, so dass ein permanentes Wechseln des EDTAs gewährleistet wurde. Dieser Schritt der Dekalzifizierung ermöglicht, dass sich die Zellen aus der anorganischen Matrix des Knochens lösen und frei vorliegen. Anschließend wurde das EDTA aus der Probe gewaschen. Dieses erfolgte, in dem das Knochenmehl-EDTA-Gemisch erneut zentrifugiert wurde und der entstandene Überstand verworfen wurde. Nun wurde das Pellet mit Aqua dest. überschichtet, aufgeschüttelt und erneut 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt viermal durchgeführt. Die erhaltenen Pellets wurden nun mit dem A//-tissue DNA Kit der Firma GEN-IAL weiter bearbeitet. Dafür wurde das Pellet mit 1000 µL des Lyse1-Puffers und 100 µL des Lyse2-Puffers aus dem DNA Kit überschichtet. Des Weiteren wurden 25 µL einer frisch hergestellten 0,8 M Dithiothreitol-Lösung und 50 µL Proteinase K hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde daraufhin 6 h oder über Nacht bei 56 °C in einem Wasserbad mit eingeschalteter Schüttelfunktion inkubiert. Dieser Schritt hatte zum Ziel, die in den Zellen enthaltenen Nukleinsäuren freizusetzen. Nach erfolgreicher Zelllyse lag eine weitestgehend klare Lösung vor, zu der 750 µL Lyse3-Puffer pipettiert wurden. Das Gemisch wurde 20-30 Sekunden leicht vermischt. Die Zugabe dieses Lyse-Puffers sollte sowohl Zellreste und Proteine als auch PCR-Inhibitoren präzipitieren und damit entfernen. Von dem entstandenen Knochenlysat wurden jeweils 1 mL in 2 mL Tubes abgefüllt. Je nach entstandener Volumina Knochenlysat wurden 3-9 Tubes befüllt. Das entstandene Knochenlysat wurde anschließend bis zur Weiterbearbeitung mit Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol bei -20 °C gelagert.

Für eine Aufreinigung mit Hilfe der Methode von Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol war zuerst die Herstellung eines TN-Puffers notwendig. Dieser wurde bei der anschließenden Dialyse benötigt. Hierfür wurde eine 1M TrisHCl Lösung hergestellt, deren pH-Wert bei 7,6 lag. 200 mL TN-Puffer enthielt letztendlich 1 mL 1M TrisHCl-Lösung sowie 0,2 mL 5M NaCl-Lösung. Der Rest wurde mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die aufgetauten Knochenlysate wurden nun mit 1 mL Phenol versetzt. Das Gemisch wurde per Hand kurz durchmischt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 min



im Rotor inkubiert. Anschließend fand eine Zentrifugation für 15 min bei 3000 rpm statt.

Das hinzugegebene Phenol bewirkte sowohl eine Denaturierung von Proteinen als auch eine Phasentrennung von organischen und anorganischen Stoffen. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 500 µL Phenol und 500 µL Chloroform/Isoamylalkohol, mit einer Zusammensetzung von 24:1, versetzt. Dieses Gemisch wurde ebenfalls erst mit der Hand kräftig und anschließend weitere 15 min gleichmäßig bei Raumtemperatur durchmischt. Nach der Durchmischung wurden die Proben 15 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser klaren Flüssigkeit wurde 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben. Chloroform bewirkte das Herauslösen von Phenol aus der Probe, was wiederum eine Verunreinigung verhindert. Isoamylalkohol wirkte der Schaumentwicklung der organischen Phase entgegen, weshalb das Chloroform hinzugesetzt wurde. Auch nach der Zugabe von 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol wurde das Gemisch erst per Hand und anschließend 15 min per Rotor durchmischt. Eine anschließende finale Zentrifugation 15 min bei 3000 rpm wurde ebenfalls durchgeführt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sowohl mit 1 mL abs. Ethanol als auch 40 µL 5M NaCl versetzt. Das entstandene homogene Gemisch wurde 1 h bei -20 °C inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde das Gemisch 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die präzipitierte DNA sammelt sich dadurch in einem Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde abdekantiert und das restliche noch im Reaktionsgefäß enthaltene Ethanol abpipettiert. Anschließend wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und mit 60 µL TE-Puffer versetzt. Das DNA-Isolat wurde daraufhin über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Im finalen Schritt erfolgte eine Dialyse. Dabei wurde das DNA-Isolat auf eine semipermeable Membran gebracht, wodurch weitere PCR-Inhibitoren beseitigt wurden. Für diesen Schritt wurden Milliporerundschalen zur Hälfte mit TN-Puffer befüllt und mit einer semipermeablen Membran versehen. Bevor die Proben tropfenweise (20 µL) auf die Membran aufgetragen wurden, fand eine kurze Zentrifugation statt, sodass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden sammelt. Die auf die Membran aufgebrachten Tropfen wurden 1-1,5 h bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurden die Tropfen wieder aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ebenfalls wurde die Membran, an den Stellen wo sich die Tropfen befanden, mit 5 µL Aqua dest. nachgespült. Das entstandene Isolat wurde wiederum bei -20 °C gelagert.

### 3.4 Quantifizierung der gDNA

Die Quantifizierung der genomische DNA wurde nach Angaben des Quantifilers® Human DNA Quantification Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einem real-time PCR-Assay. Hierfür wurden zwei targetspezifische PCR-Primer sowie spezifisch mit Fluorochromen markierte TaqMan® Sonden (Reporter- und Quencher-molekül) eingesetzt. Die TaqMan® Sonden sind zu Anfang der Amplifikation intakt. Dadurch wird die Reporterfluoreszenz durch das Quencher-molekül unterdrückt. Während des Synthesevorganges bindet die Sonde spezifisch an die komplementäre template DNA. Durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der *hot-start* DNA-Polymerase wird die TaqMan® Sonde an der template DNA hydrolysiert. Diese hat zur Folge, dass sich das Reporter- und Quencher-molekül immer mehr voneinander entfernen. Die Fluoreszenz wird aufgrund der vom Quencher-molekül ausgehenden Förster-Resonanz nicht mehr unterdrückt. Wird der Reporter nun durch die Polymerase freigesetzt, steigt die Fluoreszenz. Die Signalstärke ist damit abhängig von der DNA. Je mehr DNA die Probe enthält und damit synthetisiert wird, desto mehr Reportermoleküle werden frei und fluoreszieren. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Quantifizierung von gDNA**

Die Werte entstammen aus dem Standardprotokoll. Zu beachten sind jedoch die entsprechenden Verdünnungen des Standards, da diese als Referenz dient.

Komponente	Volumen/ Reaktion [ µL ]
Quantifiler Primer-Mix	10,5
Quantifiler PCR-Reaktions-Mix	12,5
Probe/Standard/IPC	2

Detektiert wurde mit dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems. Die Auswertung erfolgte mittels einer systemeigenen SDS-Software.

### 3.5 Systeme der Amplifizierung

Die Amplifizierung der DNA fand mit Hilfe von zwei kommerziell erhältlichen Kits statt. Zum einen handelt es sich um das PowerPlex®S5, welches vier autosomale Systeme und das geschlechtsspezifische System Amelogenin nachweist und zum anderen um das Investigator Argus Y-12. Dieses wird zum Nachweis von Y-chromosomalen STRs genutzt.

### **3.5.1 PowerPlex®S5**

Für die Prä-Amplifikation wurde ein Mastermix aus (jeweils für eine Probe angegeben) 5 µL PowerPlex®S5 5xMasterMix und 2,5 µL PowerPlex®S5 10xPrimerPairMix erstellt. Vor dem Zusammenfügen der beiden Reagenzien ist ein Durchmischen dieser essentiell. Das Volumen des DNA-Isolats richtete sich nach dessen Konzentration. Für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Menge von 0,15 ng einzusetzender DNA festgelegt. In Fällen mit zu geringem oder ohne DNA Gehalt im Isolat, wurde das maximale Volumen von 17,5 µL Probenvolumen je PCR-Ansatz gewählt. Letztendlich beinhaltete der PCR-Ansatz ein Gemisch aus 7,5 µL Mastermix, 0,15 ng DNA-Isolat und Wasser, mit welchem ein Endvolumen von 25 µL eingestellt wurde. Die einzelnen Komponenten wurden regelmäßig vermischt und anschließend auf dem Gerät platziert. Das PCR-Programm lief unter folgenden Bedingungen: Zuerst erfolgte eine initiale Denaturierung für 2 min bei 96 °C. Die darauffolgende Zyklenzahl, welche die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation umfasst, wurde auf ein Intervall zwischen 30-34 Zyklen festgelegt. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach den ersten, in eigenen Vorversuchen erhaltenen Ergebnissen der STR-Analysen. Für den Schritt der Denaturierung innerhalb der Zyklen wurde 94 °C für 30 sek gewählt. Für die Phase des Annealings wurden die Bedingungen von 60 °C für 2 min und für die Elongation 72 °C für 90 sek festgelegt. Eine finale Elongation erfolgte anschließend für 45 min bei 60 °C. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben auf 4 °C gekühlt und im Anschluss bei -20 °C gelagert. Das PCR-Protokoll richtet sich nach dem im Handbuch angegebenen Protokoll. Bis auf die variable Zyklenzahl wurde es nicht verändert.

Anschließend erfolgte die Post-Amplifikation, welche aus Gründen der Kontaminationsgefahr in einem von der Prä-Amplifikation getrennten Raum stattfand. Zur Optimierung der Ergebnisse der sich daran anschließenden Fragmentlängenanalyse wurde das ursprüngliche Protokoll des Handbuches modifiziert. Es wurden je Probe 10 µL Formamid und 0,5 µL des im Kit enthaltenen ILS600 Standard zu einem Mastermix pipettiert und miteinander vermischt. Folgend wurde 1 µL des PCR-Produkts bzw. der Allelleiter hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für 3 min auf Eis gekühlt. Die fertig aufbereiteten Proben wurden für eine nachfolgende Fragmentlängenanalyse auf dem Sequenzer platziert.

### **3.5.2 Investigator Argus Y-12**

Die Prä-Amplifikation des Argus Y-12 umfasste für jede Probe einen Mastermix, welcher aus 5 µL Reaktionsmix, 2,5 µL Primermix und 0,6 µL Taq-Polymerase hergestellt wurde. Auch in diesem Fall wurde eine einzusetzende DNA-Menge von 0,15 ng festgelegt, wodurch das Volumen des DNA-Isolats sich nach dessen Konzentration richtete. Ebenso wie in der PowerPlex®S5 Vorschrift wurde das Endvolumen von 25 µL mit Wasser hergestellt, sowie im Falle einer nicht ausreichenden Konzentration ein

Maximalvolumen von 16,9 µL DNA-Isolat eingesetzt. Auch bei diesen Proben ist ein regelmäßiges Durchmischen der Bestandteile notwendig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Für das PCR-Programm wurden die folgenden Bedingungen, welche sich nach dem Benutzerhandbuch richten, eingehalten. Mit einer initialen Denaturierung von 4 min bei 94 °C wurde ein Vorliegen der DNA-Einzelstränge und ein Aktivieren der Multi Taq2 DNA Polymerase gewährleistet. An diesen Schritt anschließend fanden 5 Zyklen mit jeweils 30sek bei 94 °C, 120 sek bei 63 °C und 75 sek bei 72 °C statt. Im zweiten PCR-Schritt wurde je nach Beschaffenheit der DNA die Anzahl der Zyklen variiert, sodass ein Intervall von 25-29 Zyklen resultiert. Während dieser Zyklen erfolgte die Phase der Denaturierung bei 94 °C 30 sek lang, die Phase des Annealing bei 61 °C für 120 sek und die Phase der Elongation 75 sek bei 72 °C. Die finale Elongation fand bei 68 °C für 60 min statt. Das fertige DNA-Produkt wurde auf 4 °C heruntergekühlt und bis zur Post-Amplifizierung bei -20 °C gelagert.

Für die Post-Amplifikation wurden dieselben Bedingungen wie beim PowerPlex®S5 Kit gewählt. Es wurden je Probe 10 µL Formamid und 0,5 µL DNA Längenstandard 550 (BTO) zu einem Mastermix vermischt. Im Anschluss daran wurde 1 µL des PCR-Produkts bzw. der Allelleiter hinzugegeben. Eine Erhitzung des Gemisches für 3 min auf 95 °C und eine anschließende Kühlung für 3 min auf Eis fanden ebenfalls statt. Die fertig amplifizierten Proben wurden für eine nachfolgende Fragmentlängenanalyse auf dem Sequenzer platziert.

### **3.6 Fragmentlängenanalyse mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer**

Der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. An sich beruht die Elektrophorese auf der Wanderung von geladenen Teilchen, welche sich in einer Lösung befinden, in einem elektrischen Feld. Diese wandern, nach Anlegen einer Spannung, zu den jeweiligen Gegenpolen. Die Wandergeschwindigkeit ist abhängig von der Ladung, Größe, anliegender Spannung sowie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke. In Sequenzern dieser Art befinden sich zwei Puffergefäße, welche durch eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden sind. Die Kapillare endet beidseitig in jeweils einer Pufferlösung. Während der Injektion taucht die Kapillare kurzzeitig in das Probengefäß um die zu analysierenden Lösungen zu applizieren. Die Analyte durchlaufen, sobald ein elektrisches Feld angelegt wurde, die Kapillare in Richtung Gegenpol und passieren dabei den Detektor [Gey, 2008]. Mittels der Data Collection Software von Applied Biosystems wurden die für den Durchlauf entsprechenden Parameter eingestellt.

Tabelle 13: Gewählte Einstellungen mit der Data Collection Software für PowerPlex®S5

<b>Parameter</b>	<b>Gerätetypische Einstellung</b>
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) A
Matrix File	none
Injektion (sek)	5
Injektion (kV)	15,0
Run (kV)	15,0
Run °C	60
Run Time ( min)	23

Tabelle 14: Gewählte Einstellungen mit der Data Collection Software für Investigator Argus Y-12

<b>Parameter</b>	<b>Gerätetypische Einstellung</b>
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) G5
Matrix File	none
Injektion (sek)	5
Injektion (kV)	15,0
Run (kV)	15,0
Run °C	60
Run Time ( min)	26

Anschließend wurden die von dem Detektor übermittelten Rohdaten mit der 310 User Software von Applied Biosystems ausgewertet. Die Daten wurden dabei in Elektropherogrammen dargestellt. Mittels dieser Software wurden für die Auswertung bedeutenden Parameter festgelegt. Diese richten sich nach den jeweiligen (rechnerbezogenen) Einstellungen.

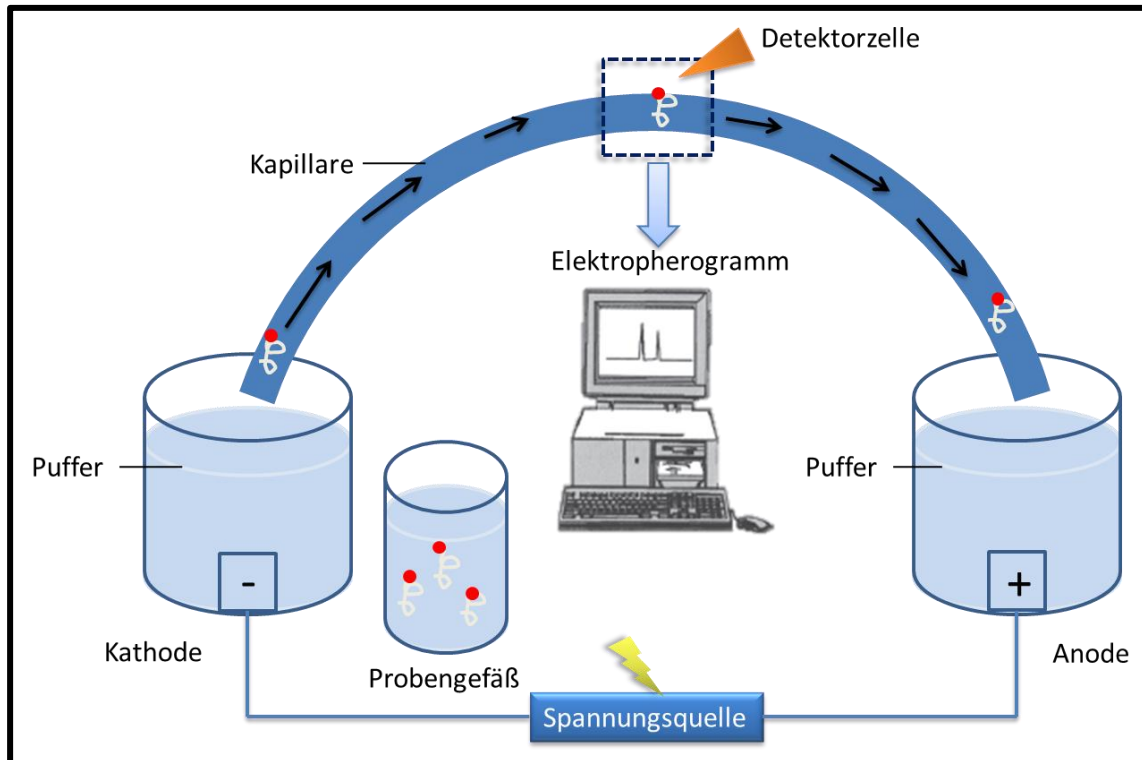


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kapillarelektrophorese [modifiziert nach Gey, 2008 und Butler, 2011]

Die Abbildung stellt schematisch die Fragmentlängenanalyse mit Hilfe der Kapillarelektrophorese dar. Es handelt sich in dem Probengefäß um die zu analysierenden mit einem Farbstoffmarkierten Fragmente. Diese werden von der Kapillare aufgenommen. Anschließend fährt die Kapillare in ein mit Puffer gefülltes Gefäß. Mit Anschluss an einen Stromkreis fangen die Fragmente an sich durch die Kapillare zu bewegen. Die Geschwindigkeit hängt dabei von verschiedenen Parametern ab. Durch eine Detektorzelle werden Signale registriert, welche direkt von einer Analysesoftware ausgewertet und in Elektropherogrammen dargestellt werden.

### 3.7 Datenbanksuche ySearch und YHRD

Die mit dem Investigator Argus Y-12 Kit ermittelten Haplotypen wurden sowohl in die ySearch als auch in die YHRD Datenbank eingegeben. Die Suche in der ySearch Datenbank beruhte auf einer Suche nach genetischen Übereinstimmungen. Es wurden die ermittelten Allele in die entsprechenden Systeme übertragen und die erlaubte genetische Distanz auf maximal eins gesetzt. Bei dem Übertragen ist zu beachten, dass das System DSY19 in der Datenbank als DYS 19/394 aufgeführt wird. Eine Eintragung des Allels in das ebenfalls in der Datenbank vorhandene System ‚DYS 19b‘ führt zu Fehlergebnissen, da das System DYS 19 fast ausschließlich hemizygot vorliegt.

Mittels der YHRD wurde die *analysis of molecular variance* (AMOVA) an den fünf Proben angewendet. Die Haplotypen wurden dafür in eine Excel-Tabelle eingegeben und hochgeladen. Das Prinzip der AMOVA basiert auf der molekularen Distanz zweier Haplotypen, die mit Hilfe des *single step mutation* (SMM) Modells ausgedrückt wird.

Diese molekulare Distanz beschreibt die Mindestzahl an Mutationseignissen, die zwei Haplotypen voneinander trennt. Das Verhältnis Inter-Populationsvarianz  $\sigma_a^2$  zur molekularen Varianz  $\sigma^2$  wird dabei über den Differentialindex  $\Phi_{ST}$  angegeben. Je größer der Wert des Differentialindex  $\Phi_{ST}$  ist, desto stärker unterscheiden sich die zwei Haplotypen. Diese Methode wird vor allem in der Populationsgenetik angewandt und klärt so die Verwandtschaftlichkeit zwischen Populationen [Roewer, 2000].

Es wurden in einem ersten Vergleich die fünf Haplotypen als eine Population gewertet und mit den Populationen aus Deutschland, Tschechien und Polen verglichen. Aufgrund der Ergebnisse wurden anschließend die Haplotypen nach ihren ermittelten Haplogruppen, die mit Hilfe der ySearch bestimmt wurden, sortiert. Über eine Recherche im Internet wurde die für die Haplogruppen typischen Regionen bestimmt. Tabelle 15 beschreibt die verwendeten Haplotypen, deren bestimmte Haplogruppe und die gewählten Regionen, aus denen die Populationen stammen, mit denen sie während der AMOVA verglichen worden.

**Tabelle 15: AMOVA-Testung der Proben aufgrund ihrer Haplogruppen**

Die Zuordnung zu den Haplogruppen erfolgte anhand der erhaltenen Ergebnisse der ySearch.

Probe	Haplogruppe	Region
F1;2-2 F4-5	R1b	Germany, Italy, Spain, Portugal, India
F2-3	I1	Germany, Russia Federations, Iceland, Swedish, Netherland
F1-1	I2	Germany, Slovakia, Croatia, Romania, Serbia

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Aufbereitetes Spurenmaterial**

Nachdem die Knochenfragmente und Zähne in Knochenmühle bzw. Mikrotom verarbeitet wurden, konnten Knochenmehlmengen von 0,79 g bis 3,72 g bzw. Zahnmehl von 0,62 g bis 2,24 g erhalten werden. Aufgrund des Zusammenfassens des Zahnmehls wurden Mengen von 0,62 g bis 5,37 g erreicht. Die nach der Dekalzifizierung entstanden Lysatmengen umfassten ein Volumen von 3 mL bis 8,4 mL. Nach diesem Volumen richten sich äquivalent die mit der Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung entstandenen Isolatmengen. So kann man pro angefangenem Milliliter Knochen- bzw. Zahnlysat 75 µL DNA-Isolat annehmen. Die ermittelten DNA-Konzentrationen lagen zwischen 0,002 ng/µL und 0,089 ng/µL für das Knochenmaterial und zwischen 0,008 ng/µL und 0,35 ng/µL für das Zahnmaterial. Das Schädeldach von Fund 2 sowie der linke Humerus und die rechte Tibia von Fund 4 zeigten keine Quantifizierungsergebnisse.

Die Methodik der Aufbereitung, zu der sowohl nach der mechanischen Aufbereitung die Dekalzifizierung als auch die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol zählen, wurde mit Hilfe eines rezenten Knochenfragments etabliert und überprüft. Für diese Probe resultierten die Quantifizierungsergebnisse zwischen 91,95 ng/µL und 123,4 ng/µL.



**Tabelle 16: Ergebnisse der Knochenaufbereitung**

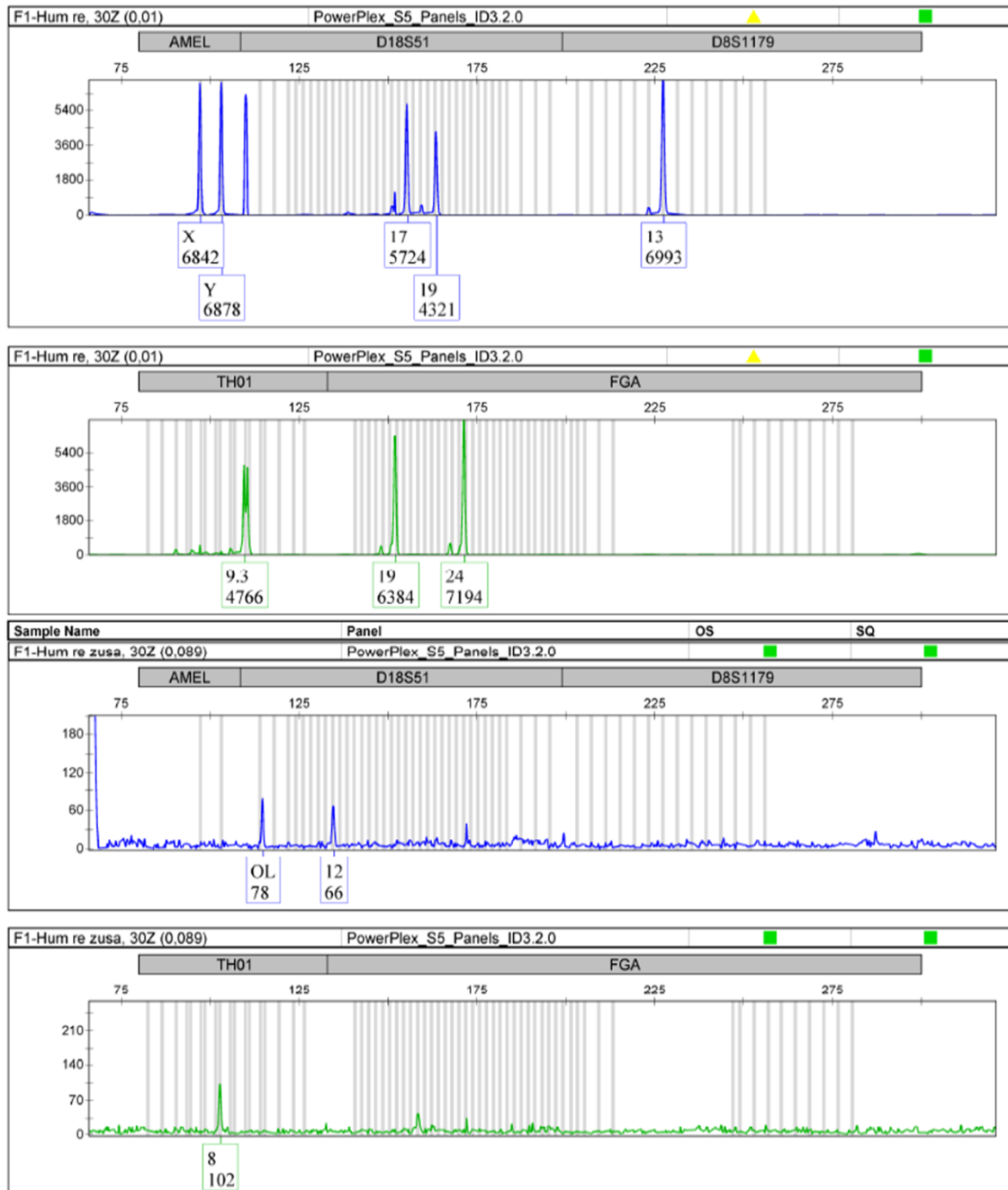
In der Tabelle sind die einzelnen Proben mit dem eingesetzten Knochenmaterial und die Konzentration des DNA-Isolats angegeben.

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Eingesetztes Knochenmehl [g]</b>	<b>Konzentration [ ng/ µL]</b>
F1-Calvaria	1,35	0,017
F1-Humerus dexter	1,99	0,01
F1-Humerus dexter additus	1,45	0,089
F1-Femur dexter	2,23	0,039
F1-Femur sinister additus	1,01	0,023
F1-Femur sinister	0,79	0,022
F1-Tibia dextra	2,5	0,035
F1-OK	0,62	0,021
F2-Calvaria	2,29	-
F2-Humerus dexter	3	0,003
F2-Femur dexter	1,33	0,013
F2-Corpus Tibiae sinistrae additus	0,79	0,04
F2-Tibia sinistra	1,82	0,008
F2-Tibia dextra	1,06	0,017
F2-OK	3,1	0,03
F2-UK	2,21	0,008
F3-Calvaria	2,72	0,004
F3-Humerus sinister	2,18	0,002
F3-Femur dexter	2,55	0,003
F3-Tibia sinistra	3,72	0,002
F4-Cranium	1,45	0,013
F4-Humerus sinister	1,8	-
F4-Femur sinister	2,22	0,037
F4-Tibia sinistra	2,43	0,004
F4-Tibia dextra additus	2,72	-
F4-OK	2,31	0,063
F4-UK	2,94	0,04
F5-OK	5,14	0,35
F5-UK	2,59	0,144

## 4.2 Profilerstellung mittels der Multiplex-Kits

### 4.2.1 Profilerstellung mit dem PowerPlex®S5 Kit

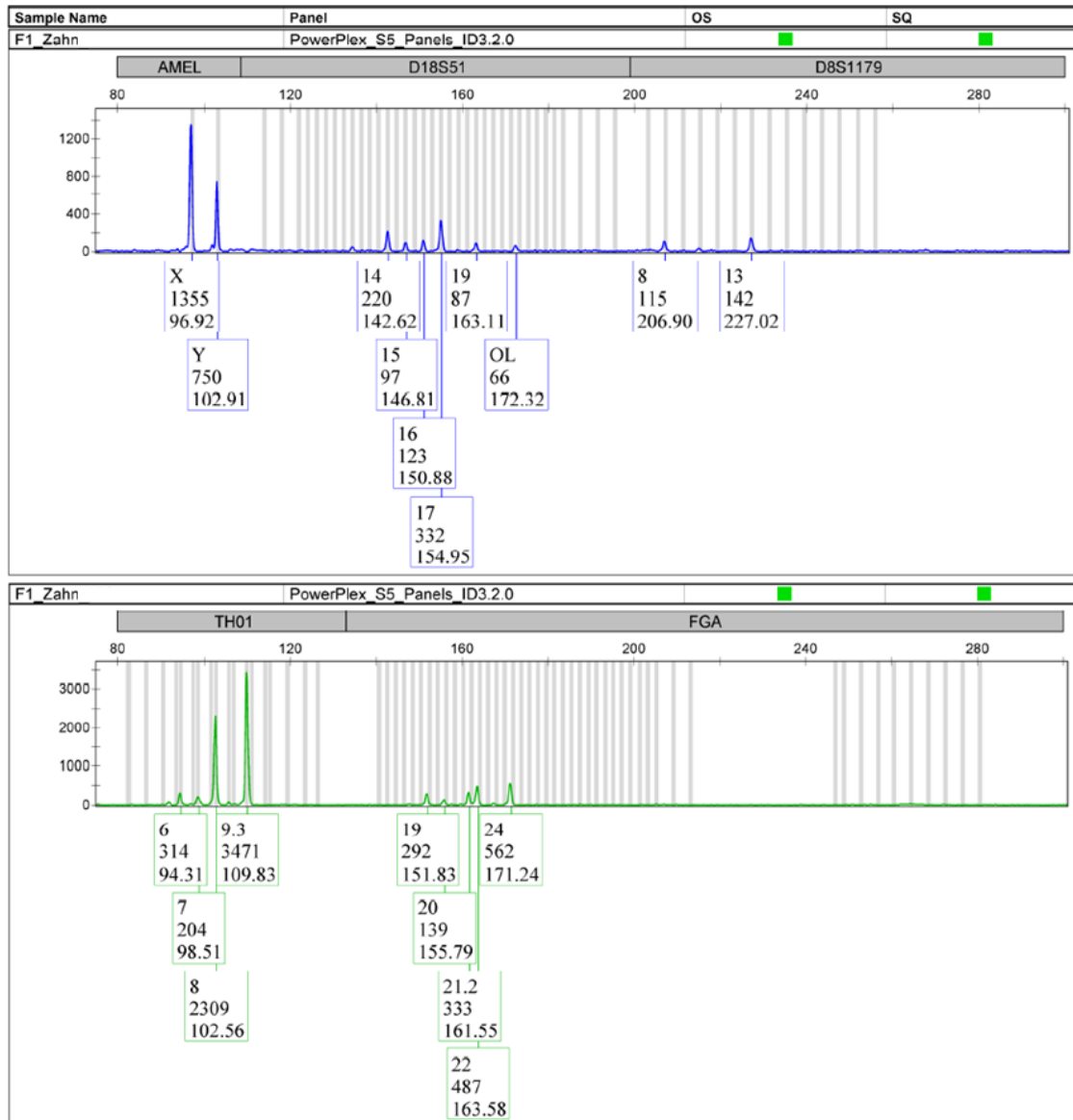
Mit dem PowerPlex®S5 Kit der Firma Promega wurden vier autosomale STR-Systeme und das geschlechtsspezifische STR-System Amelogenin bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse konnten Aussagen über die Geschlechter getroffen werden und eine Zuordnung der Knochenfragmente stattfinden. Die Elektropherogramme zeigten in allen Fällen für das System Amelogenin ein X und ein Y Allel, weshalb alle Proben männlichen Geschlechts sind. Eine Untersuchung der STR-Systeme des Y-Chromosoms schloss sich an. Insgesamt konnte anhand dieser Ergebnisse angenommen werden, dass es sich um fünf bis sieben Individuen handeln muss. Eine genaue Anzahl konnte aufgrund von Artefaktbildung und Allelausfällen nicht bestimmt werden. Die Ursache hierfür lässt sich auf die Degradation der DNA zurückführen. So auch die unterschiedliche Ausprägung der einzelnen Elektropherogramme. Für die Probe F1-Humerus dexter ergab sich ein vollständiges STR-Profil, während für die Probe F1-Humerus dexter additus lediglich schwach ausgeprägte Peaks vorlagen, obwohl es sich bei beiden um ein und dieselbe Art von Knochen handelt, beide innerhalb der Fundregion eingelagert waren und die DNA-Konzentration des *Humerus dexter additus* weitaus höher lag (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Vergleich der PowerPlex®S5 STR-Profil zwischen F1-Humerus dexter und F1-Humerus dexter additus**

Trotz höherer Ausgangskonzentration liegen die Peaks des F1-Humerus dexter additus (unteres Profil) deutlich niedriger als die des F1-Humerus dexter.

Trotz zum Teil stark ausgeprägten Artefakten konnte keine Kontamination durch Fremd-DNA innerhalb der Knochenfunde festgestellt werden. Die Zahnproben zeigten im Vergleich zu den Knochenproben deutlich ausgeglichene STR-Profile. Über die Probe F1-OK konnte kein Urteil bezüglich der Zugehörigkeit gefällt werden. In diesem Elektropherogramm werden, aufgrund von Artefakten, Peaks amplifiziert, die sich sowohl zum Individuum F1-1 als auch F1;2-2 zuordnen lassen.



**Abbildung 9: STR-Profil der Zahnprobe F1-OK**

Aufgrund der Artefakte kann keine genaue Aussage über die Zugehörigkeit dieser Probe getroffen werden. Eine neue Amplifizierung dieser Probe wäre erforderlich.

#### 4.2.2 Profilerstellung mit dem Investigator Argus Y-12

Das Investigator Argus Y-12 Kit der Firma Qiagen ermöglichte eine genauere Zuordnung der Knochenfragmente. Anhand dieser STR-Profile konnte die Probe F1-(2), aufgrund hoher Frequenzähnlichkeit, der Probe F1;2-2 zugeordnet werden. Dadurch wurde die Anzahl der Individuen auf 5-6 begrenzt. Ob diese Zuordnung korrekt ist, müsste mit einer erneuten Untersuchung dieser Probe getestet werden. Die Probe F1-Humerus dexter additus wurde als einzelnes Individuum betrachtet. Jedoch ist die Frequenzähnlichkeit zum Individuum F1;2-2 sehr hoch, weshalb vermutet wird, dass dieser Knochen dazu zu zählen ist. Dieser Behauptung sollte in einer weiteren Amplifikation nachgegangen werden. Anhand dieser Ergebnisse ergaben sich fünf vollständige Haplotypen. Keine der aufgeteilten Individuen besitzen denselben

Haplotyp. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine verwandtschaftliche Beziehung innerhalb der Patrillinie vorliegt.

Regelmäßig hat sich in den STR-Profilen, die mit dem Argus Y-12 erstellt wurden, gezeigt, dass längere Fragmente nicht detektiert wurden. Kürzere Fragmente hingegen zeigten höhere RFU. Diese Abnahme der RFU bezüglich der Fragmentlängen lässt sich ebenfalls Degradationsprozessen zuschreiben.

Die ermittelten Haplotypen der Proben wurden für eine anschließende bioinformatische Auswertung genutzt. Hierfür wurden die Ergebnisse in die Datenbanken ySearch und YHRD überführt.

### **4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Sowohl für das PowerPlex®S5 Kit als auch das Investigator Argus Y-12 Kit zeigten sich vollständige Elektropherogramme unter den gewählten Standardbedingungen von 0,15 ng eingesetzter gDNA. Die Standardzyklenzahl betrug 30 bzw. 32 Zyklen, sodass immer zwei Elektropherogramme für eine Probe zu Verfügung standen. Dennoch kam es auch zu Allelausfällen. Aus diesem Grund fand eine weitere Anpassung der Parameter in der Art statt, dass die Anzahl der Zyklen auf maximal 34 Zyklen erhöht und eine maximale Menge von 1,84 ng DNA eingesetzt wurde. Hierdurch wurde es möglich, alle Systeme genauestens zu zuordnen.

**Tabelle 17: Mit PowerPlex®S5 Kit ermittelte Allel-Verteilung**

Die ersten zwei Spalten beschreiben die Probe während die vierte Spalte das STR-Profil der jeweiligen Probe aufführt. Spalte drei schließt die Neubezeichnung der Proben aufgrund ihrer Zuordnung ein. Die Probe von Fundort 4 *Tibia dextra additus* zeigte in keinem Elektropherogramm signifikante Ergebnisse.

Fundort	Probe	Proben- bezeichnung	STR-Profil				
			Amelo.	D18S51	D8S1179	TH01	FGA
1	Calvaria, Femur de., Femur si., Humerus de., Tibia de.	<b>F1-1</b>	X,Y	17,19	13	9.3	19,24
1	Femur si. ad.	<b>F1;2-2</b>	X,Y	12,14	8	8,9.3	22
1	Humerus de. ad.	<b>F1-(2)</b>	X,Y	12,14	(14)	8,9.3	(21), 22
2	Calvaria, Femur de., Tibia si.	<b>F2-3</b>	X,Y	15,16	10,13	6,9.3	20,22
2	Humerus de.	<b>F2-3</b>	X,Y	(13),1 5,16	11,13	5,6,9. 3	20,22
2	Tibia de.	<b>F2-3</b>	X,Y	15,16	12,13	6,8,9. 3	21.2, 22,25
2	Corpus Tibiae si. ad.	<b>F1;2-2</b>	X,Y	12,14	8,12	8,9.3	22,(2 5)
3	Calvaria	<b>F3-4</b>	X,Y	15,16, 17	11,14	8,9.3	20,25
3	Femur de., Humerus si., Tibia si.	<b>F3-4</b>	X,Y	15,16	11,14	8,9.3	20,25
4	Cranium, Femur si., Humerus si., Tibia si.	<b>F4-5</b>	X,Y	13	10,15	9.3	21,23
4	Tibia de. ad.	-	<b>Trotz Erhöhung der Zyklenzahl und DNA-Menge keine Ergebnisse (vereinzelte Peaks mit sehr geringer Höhe!)</b>				

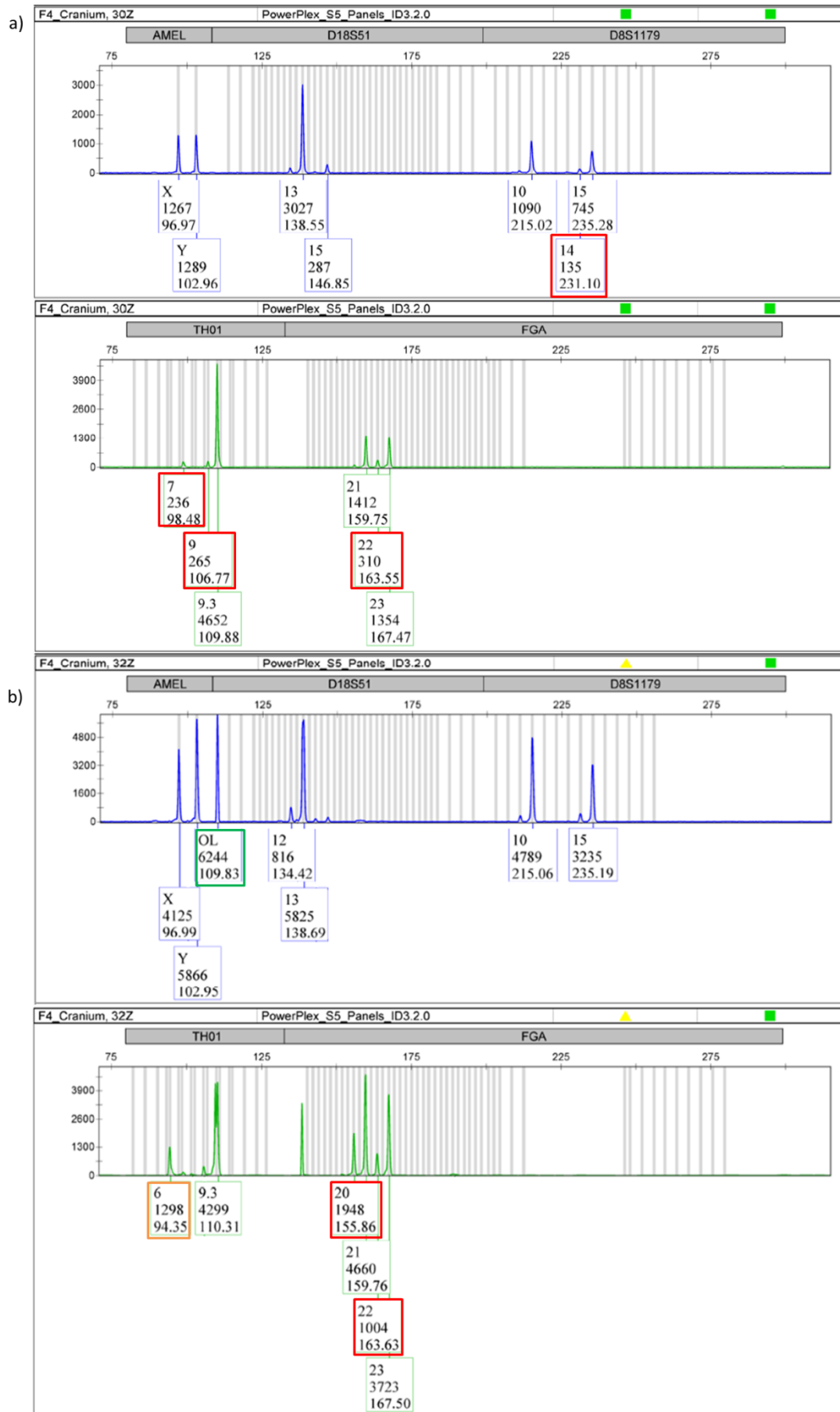
Ergebnisse aus der Typisierung der Proben mit den Multiplex Kits wurden anschließend zusammengeführt. Aus dieser Zuordnung heraus erhielten die Proben neue Bezeichnungen, die Fundort und Individuum charakterisieren. Die Probe F1-1 beschreibt dabei die Knochenfragmente, welche am Fundort 1 gefunden wurden und zum Individuum 1 gehören.

Tabelle 18: Autosomale und Y-chromosomale STR-Systeme der einzelnen Proben

Autosomale und Y-chromosomale STR-Systeme															
Probe	Amel.	D1	D8	TH01	FGA	DYS 439	DYS 437	DYS 390	DYS 385	DYS 391	DYS 389-I	DYS 19	DYS 189-II	DYS 393	DYS 392
F1-1	X,Y	17,19	13	9,3	19,24	11	14	23	16	10	13	16	30	15	12
F1;2-2	X,Y	12,14	8	8,9,3	22,(24)	11	15	23	14	11	13	14	28	12	13
F1-(2)	X,Y	12,14	14	8,9,3	21,22	11		23		11	13	14	28	12	(11), 13
F2-3	X,Y	15,16	10,13	6,9,3	20,22	11	14	23	14	10	13	16	29	13	11
F3-4	X,Y	15,16	11,14	8,9,3	20,25	11	15	23	16	10	13	15	30	12	11
F4-5	X,Y	13	10,15	9,3	21,23	11	15	24	14	11	13	14	30	13	13

In den Elektropherogrammen waren häufig *Allelic-drop-outs* zu erkennen. Hierbei handelt es sich um einen Verlust von Allelen in STR-Systemen aufgrund geringer DNA-Menge. Des Weiteren finden sich in einigen Systemen *Stutter-Peaks* und *Pull-ups* (Farbdurchschläge), welche STR-Profile verfälschen können. Da die Proben sowohl mit 30 Zyklen als auch mit 32 Zyklen amplifiziert wurden, konnten Artefakte erkannt und damit als echte Peaks ausgeschlossen werden. Ein weiteres Merkmal der Elektropherogramme ist, dass mit zunehmender Länge der Fragmente die RFU (*engl.* relative fluorescence units) abnimmt (Abbildung 10).





### Abbildung 10: Vergleich der PowerPlex®S5 Elektropherogramme von F4-Cranium

Die Abbildung zeigt das Ergebnis nach der Amplifizierung der Probe F4-Cranium mit dem PowerPlex®S5 Kit. Die eingesetzte DNA betrug jeweils 0,15 ng, jedoch unterscheidet sich die Zahl der Zyklen während der PCR. In Abbildung a) durchlief die Probe 30 Zyklen. Abbildung b) repräsentiert die PCR mit 32 Zyklen. Deutlich zu erkennen ist, dass mit einer Erhöhung der Zyklenzahl die Peakhöhe zunimmt. Rot markierte Peaks sind *Stutter-Peaks*, diese sind vor allem in Abbildung b) ausgeprägter. Des Weiteren kam es in Abbildung b) im System TH01 zum *Allelic-drop-in* (orange) sowie im Übergangsbereich von Amelogenin zum System D18S51 zum *Pull-up* (grün).

### 4.3 Ergebnisse der Datenbanksuche ySearch und YHRD

Alle fünf Haplotypen zeigten in der ySearch Resultate. Dabei wurden Benutzer ID, Nachname, Herkunft, Haplogruppe, Testsystem, Anzahl der übereinstimmenden Marker und genetische Distanz angegeben. Die Angaben des Testsystems, mit der sich die betreffende Person hat testen lassen sowie Benutzer ID wurden nicht weiter betrachtet. Aus diesem Grund sind diese in der folgenden Ergebnistabelle für das Beispiel von F1-1 nicht aufgeführt (Tabelle 19). Anhand der erhaltenen Daten wurde den Proben die jeweilig angegebene Haplogruppe zugeordnet. Nur Probe F3-4 konnte keiner Haplogruppe zugeordnet werden, da in dieser Ergebnistabelle nur ein Eintrag erfasst wurde.

**Tabelle 19: Ergebnistabelle der ySearch für den Haplotyp F1-1**

Der Haplotyp der Probe wurde in die ySearch eingegeben und brachte folgende Ergebnistabelle. Die festgelegte genetische Distanz durfte maximal eins betragen.

Nachname	Herkunft	Haplogruppe	Übereinstimmende Marker	Genetische Distanz
I-E Type	Unknown	I2b1c*	12	1
Gatten	Unknown	Unknown	12	1
Felsing	Germany	I2b1	12	1
Giraco	Armenia	I2b1c	12	1
Meyer	Saxony, Germany	I2b1	12	1
Guess	USA	Unknown	12	1
Galui	Roma, Italy	Unknown	12	1
Guess	USA	Unknown	12	1
Penix	USA	Unknown	11	1
Lowe	VA, DC, MD, PA, IL, CA, America	Unknown	11	1
Wastle	USA	Unknown	10	1
Howell	Wales	Unknown	10	1
Somerville	Robertson Country, Tennessee, USA	I2b1	10	1
Wooten	Unknown	Unknown	10	1
Carter	Kempston, England	I2b1	10	1
Penix	England	Unknown	10	1
Parker	England	Unknown	10	1

Die erste AMOVA-Testung, in welcher die fünf Proben zu einer Population (C-Kn63/02) zusammengefasst wurden, zeigte in der Gegenüberstellung mit den gewählten Populationen einen extrem hohen Wert für den Differentialindex  $\Phi_{ST}$  (unterhalb der Diagonale). Dieser lag im Bereich zwischen 0,9404 und 0,9428. Dem gegenüber wiesen Differentialindizes der Populationen, die geografisch gesehen direkt nebeneinander liegen, einen weitaus geringeren Wert ( $\Phi_{ST}$  0,0203 bis 0,0877) auf. Aus diesem Wert heraus ließ sich schließen, dass ein Zusammenfügen der Proben zu einer Population trotz signifikanten  $p$ -Werts (oberhalb der Diagonalen) keine plausiblen Ergebnisse bringt. Die Unterteilung der Proben in ihre Haplogruppen hatte zum Ziel, reproduzierbare Ergebnisse zu liefern und möglicherweise die Zuordnung der Proben zu einer Population.

**Tabelle 20: Werte für den Differentialindex  $\Phi_{ST}$**

Ergebnis nach der AMOVA-Testung in dem alle fünf Proben als eine Population angenommen worden. Anhand dieses Ergebnisses wurde eine Klassifizierung der Proben durchgeführt.

Population	Czech Republic	Germany	Poland	C-Kn
Czech Republic	-	0.0000	0.0000	0.0000
Germany	0.0267	-	0.0000	0.0000
Poland	0.0203	0.0877	-	0.0000
C-Kn63/02	0.9404	0.9407	0.9428	-

**Tabelle 21: Ergebnisse der AMOVA nach der Sortierung in Haplogruppen.**

Unterhalb der Diagonalen ist der Differentialindex  $\Phi_{ST}$  und oberhalb die Signifikanz ( $p$ -Wert).

Population	Germany	India	Italy	Portugal	Spain	F1;2-2,F4-5
Germany	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004
India	0.1650	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002
Italy	0.0451	0.0710	-	0.0000	0.0000	0.0000
Portugal	0.0145	0.1501	0.0371	-	0.0000	0.0012
Spain	0.0356	0.2249	0.0922	0.0159	-	0.0004
F1;2-2,F4-5	0.9613	0.9428	0.9518	0.9517	0.9657	-
Population	Germany	Iceland	Netherlands	Russian Federation	Sweden	F2-3
Germany	-	0.2203	0.0007	0.0000	0.0000	0.0639
Iceland	0.0017	-	0.0008	0.0000	0.0406	0.0203
Netherlands	0.0191	0.0359	-	0.0000	0.0000	0.0496
Russian Federation	0.0505	0.0461	0.0947	-	0.0000	0.0587
Sweden	0.0214	0.0078	0.0595	0.0629	-	0.0589
F2-3	0.3713	0.4620	0.5101	0.3855	0.3721	-
Population	Croatia	Germany	Romania	Serbia	Slovakia	F1-1
Croatia	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013
Germany	0.1346	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0118
Romania	0.0207	0.1182	-	0.0000	0.0000	0.0049
Serbia	0.0443	0.0728	0.0612	-	0.0182	0.0110
Slovakia	0.0437	0.0540	0.0462	0.0044	-	0.0030
F1-1	0.5922	0.6091	0.5612	0.5726	0.5648	-

## **5 Diskussion**

### **5.1 Auswertung Quantifizierungsergebnisse in Hinblick auf die Knochenregion**

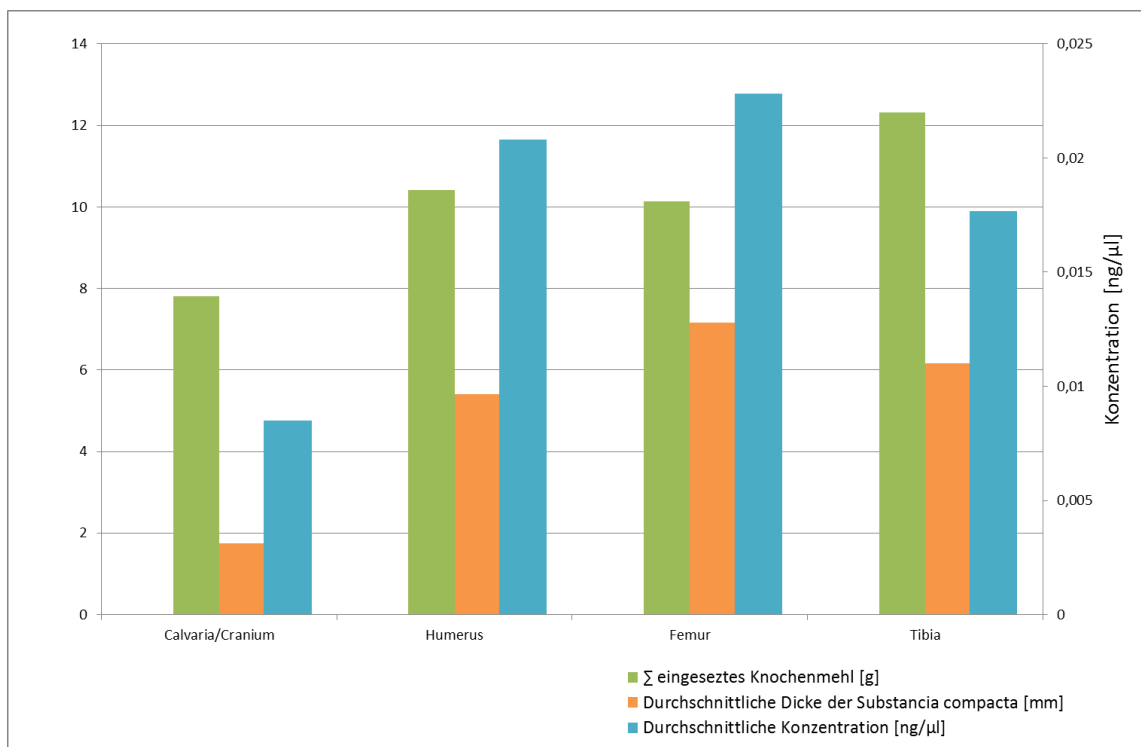
Zur Effektivitätsüberprüfung des Protokolls für die Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion wurden Vergleichsproben desselben Fundes aus dem Jahr 2011 gewählt. Bei diesen Proben handelt es sich ebenfalls um lange Röhrenknochen sowie Zahnmaterial. Das ursprünglich eingesetzte Knochenmehl lag in diesem Fall zwischen 2,35 g und 6,84 g. An Zahnmehl wurde zwischen 1,6 g und 2,41 g eingesetzt. Die DNA dieser Proben wurde ebenfalls mit Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen von 2011 lagen in einem Intervall von 0,002 ng/μL bis 0,18 ng/μL für das Knochenmaterial und 0,066 ng/μL bis 0,629 ng/μL für das Zahnmaterial. Stellt man nun die Quantifizierungsergebnisse von 2011 mit den jetzigen gegenüber, zeigen sich kaum Unterschiede in Bezug auf die ermittelte Konzentration des Knochenmehls. Für das Zahnmehl zeigte sich jedoch, dass die jetzigen Ergebnisse trotz größerer eingesetzter Menge an Zahnmehl eine geringere Ausbeute von maximal 0,35 ng/μL brachten. Das Zahnmaterial zeigte im Vergleich zu dem Knochenmaterial bessere Quantifizierungsergebnisse.

Knochenproben bei denen kein Quantifizierungsergebnis erhalten wurde, sollten erneut aufbereitet werden. Dabei sind mehr als 3 g Knochenmehl einzusetzen.

Das Vergleichsmaterial des rezenten Knochens, welches Konzentrationen zwischen 91,95 ng/μL und 123,4 ng/μL erbrachte, zeigte, dass die Extraktionsmethode mit Phenol-Chloroform für Knochenmaterial geeignet ist. Die an den historischen Knochen- bzw. Zahnproben erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Effektivität dieses Protokolls.

Es hat sich gezeigt, dass Knochenfragmente aus Regionen mit einem hohen Anteil an *Substantia compacta*, eine größere DNA-Ausbeute liefern als Fragmente aus einer Region mit einer weniger kompakten Schicht (Abbildung 11). Es ist deutlich zu erkennen, dass Fragmente von *Humerus*, *Femur* oder *Tibia* bei einer Dicke der *Substantia compacta* von 5,4 mm bis 7,2 mm eine durchschnittliche DNA-Konzentration von über 0,015 ng/μL erbrachten, wobei die durchschnittlichen DNA-Konzentrationen für *Humerus* und *Femur* sogar über 0,02 ng/μL liegen. Fragmente aus den cranialen Regionen zeigten hingegen nur Konzentration bis zu 0,0085 ng/μL bei einer Dicke der kompakten Schicht von durchschnittlich 1,75 mm. Es wäre zu diskutieren, dass weniger Knochenmehl aus den cranialen Regionen verarbeitet wurde und deswegen die geringeren Konzentrationen folgen, jedoch liegt zwischen den eingesetztem Material an *Calvaria/Cranium* und *Femur* nur ca. 2 g. Die Differenz der Konzentrationen hingegen liegt bei 0,0143 ng/μL. Aus diesem Diagramm heraus lässt

sich die Hypothese aufstellen, dass je dicker der Bereich der *Substantia compacta* eines Knochens ist, desto höher ist die DNA-Ausbeute. Diese Hypothese wäre zu untermauern, indem eine repräsentative Anzahl an Knochenfragmenten aus cranialen und postcranialen Skelettmaterial verwendet und unter gleichen Vorrausetzungen (Menge an Knochenmehl, Dekalzifizierung, DNA-Extraktion) aufbereitet würde. Interessant wäre dabei ein Vergleich zwischen rezentem und prähistorischem Untersuchungsmaterial.



**Abbildung 11: Vergleich der Knochenregionen in Bezug auf die DNA-Konzentration**

Das Diagramm vergleicht die gewählten cranialen und postcranialen Knochenregionen in Bezug auf die eingesetzte Menge an Knochenmehl (grün), Dicke der *Substantia compacta* (orange) und der ermittelten DNA-Konzentration (blau). Es zeigt sich, dass die DNA-Ausbeute signifikant von der Dicke der kompakten Knochenschicht abhängig ist.

## 5.2 Typisierung der Proben anhand der Elektropherogramme

Die vier autosomalen STR-Systeme sowie das geschlechtsspezifische STR-System Amelogenin des PowerPlex®S5 Kit zeigten, dass es sich bei den Knochenproben um ca. fünf bis sieben Individuen handeln muss. Durch verschiedene Artefakte konnte eine genaue Zuordnung der Profile erst durch die Hilfe der Investigator Argus Y-12 Kit erfolgen. Die Probe F2-(2) konnte noch nicht genau zugeordnet werden. Es ist zu vermuten, dass dieses Fragment zur Probe F1;2-2 zählt. Eine erneute Amplifikation ist in jedem Fall nötig. Die Probe F4 *Tibia dextra additus* ergab in allen Amplifikationen keine auswertbaren Elektropherogramme. Aufgrund der fehlenden Ergebnisse und der

anderen Struktur im Vergleich zu den restlichen Proben wurde vermutet, dass dieses Fragment tierischen Ursprung ist, was durch die Einholung einer anthropologisch-morphognostischen Einschätzung bestätigt werden konnte. Das Zahnmaterial wurde ebenfalls mit dem PowerPlex®S5 Kit amplifiziert. Es zeigte sich, dass sich die Probe F1-OK zu keiner der Individuen zuordnen lies. Artefaktbildungen und *Allelic-drop-outs* schränken oftmals die Erstellung eines aussagekräftigen STR Profils ein. Es wird vermutet, dass der Zahn des Oberkiefers zu F1-1 oder zu F1;2-2 zählt. Dies wäre mit einer erneuten Amplifizierung zu testen. Gegebenenfalls sollten zusätzlich die Testsysteme des Investigator Argus Y-12 genutzt werden. Die Proben F2-OK und F2-UK konnten dem Individuum F2-3 zugeordnet werden. Die Proben F4-OK und F4-UK zeigten eine Übereinstimmung im STR-Profil mit dem Individuum F4-5. Die getestet Zahnproben von Fund 5 konnten keinem der bestehenden Individuen zugeordnet werden. Daher ist mit Sicherheit zu behaupten, dass Proben von mindestens sechs Individuen gefunden wurden. Der Unter- und Oberkiefer von Fund 5 zeigte das gleiche autosomale STR-Profil, weshalb sie zu einem Individuum zählen. Eine Amplifizierung mit dem Investigator Argus Y-12 würde sich auch in diesem Fall anschließen.

Vor allem *Spurious Peaks* und Allelausfälle erschwerten die Auswertung der Profile. Die häufigsten *Spurious Peaks* bilden *Stutter-Peaks*, *Noise* (Hintergrundrauschen) und *Pull-ups* (Farbdurchschläge). Diese extra Peaks entstehen durch technische Artefakte, die zu unvermeidbaren Messfehlern führen [URL-1].

Farbdurchschläge, die sich aufgrund ihres steilen Anstiegs von echten Peaks unterscheiden, konnten leicht bei der Profilerstellung herausgefiltert werden. Diese entstehen sobald ein Marker zu konzentriert fluoresziert. Die erhöhte Fluoreszenz bewirkt, dass die Farben der anderen Marker mit ansteigen und als Allel detektiert werden. Diese können durch eine neue Amplifikation, in der weniger template DNA genutzt wird, eliminiert werden. Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung des Elektropherogramms wäre eine Verkürzung der Injektionszeit während der Kapillarelektrophorese, dadurch gelangt weniger DNA in den Durchlauf und die zu detektierenden Peaks weisen deutlich geringere RFU auf. Ist das Problem nicht auf eine zu hohe Menge an DNA zurückzuführen, ist es zum Teil notwendig einen Lauf mit neuer Matrix und Probe zu starten [URL-1].

*Stutter-Peaks* bezeichnen kleine Peaks, die zum Großteil vor echten Peaks gelagert sind. Es ist ferner die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass sich ein *Stutter-Peak* hinter einem echten Peak befindet. Das Auftreten von dieser Art der Artefakte ist abhängig von der Zahl und Länge der Repeats sowie der Länge der Allele. Während des Amplifizierungsprozesses entstehen *Stutter-Peaks* infolge von Polymerasefehlern als Nebenprodukte. Im Rahmen der forensischen Spurenanalytik sind *Stutter-Peaks* bei Vorliegen von Einzelspuren leicht anhand ihrer Größe und Position (ca. 4 bp von echtem Peak entfernt) zu erkennen. Jedoch ist eine Zuordnung dieser innerhalb von

Mischspuren nur bedingt möglich. Eine genaue Erkennung, ob es sich bei diesem Peak nicht doch um einen Spurenmitverursacher handelt, kann nicht gewährleistet werden. *Noise* bezeichnet das Hintergrundrauschen des Gerätes, das in allen Proben auftritt. Zufällige Impulse, die durch Luftblasen innerhalb der Kapillare, Harnsäurekristalle oder Probenkontamination entstehen, können größere Artefakte bilden, die anschließend als echte Peaks detektiert werden bzw. echte Peaks überlagern.

Weitere technische Artefakte wie *Spikes* und *Blobs* sind reproduzierbar und werden bei einem weiteren Durchlauf nicht an derselben Position wieder auftauchen [URL-1].

Der *Allelic-drop-out* Effekt tritt vor allem bei geringen Mengen an DNA und aDNA auf. Es handelt sich dabei um einen Ausfall von einem Allel infolge einer Ungleichverteilung im heterogenen DNA-Gemisch. Als Folge wird das geringer konzentrierte Allel nicht mehr detektiert. Eine Prolongations-PCR, in der die Elongationsphase mit jedem Zyklus verlängert wird und damit einen Abbruch der Synthese vor Erreichen des Endproduktes verhindert, soll diesen Effekt vermeiden [URL-2]. Ebenfalls kommt es bei geringen DNA-Mengen zu Fällen von *Allelic-drop-in*. Hierbei handelt es sich um Artefakte, die als echte Peaks detektiert werden. Ein Ausschluss von *Allelic-drop-in* kann durch eine erneute Amplifizierung erzielt werden. Die Parameter sind dafür gegebenenfalls zu ändern.

Viele der Proben bestätigten den Sachverhalt, dass mit zunehmender Fragmentlänge die RFU abnimmt. Dies ist ein Indikator für aDNA. Degradationsprozesse wie Hydrolyse oder Oxidation führen zur Fragmentierung des DNA-Strangs. Diese Zerlegung hat zur Folge, dass Primer während der PCR nur an Fragmente binden, bei denen eine vollständige Bindungsstelle vorliegt. Nicht nur die Fragmentierung innerhalb von Primerbindungsstellen wirkt sich auf die Amplifizierung aus, sondern auch Punktmutationen. Während Transversionen bzw. Transition innerhalb der Repeats zu keiner Verfälschung der Ergebnisse führen, kann eine Mutation dieser Art in der Primerbindungsregion den Ausfall des Systems verursachen.



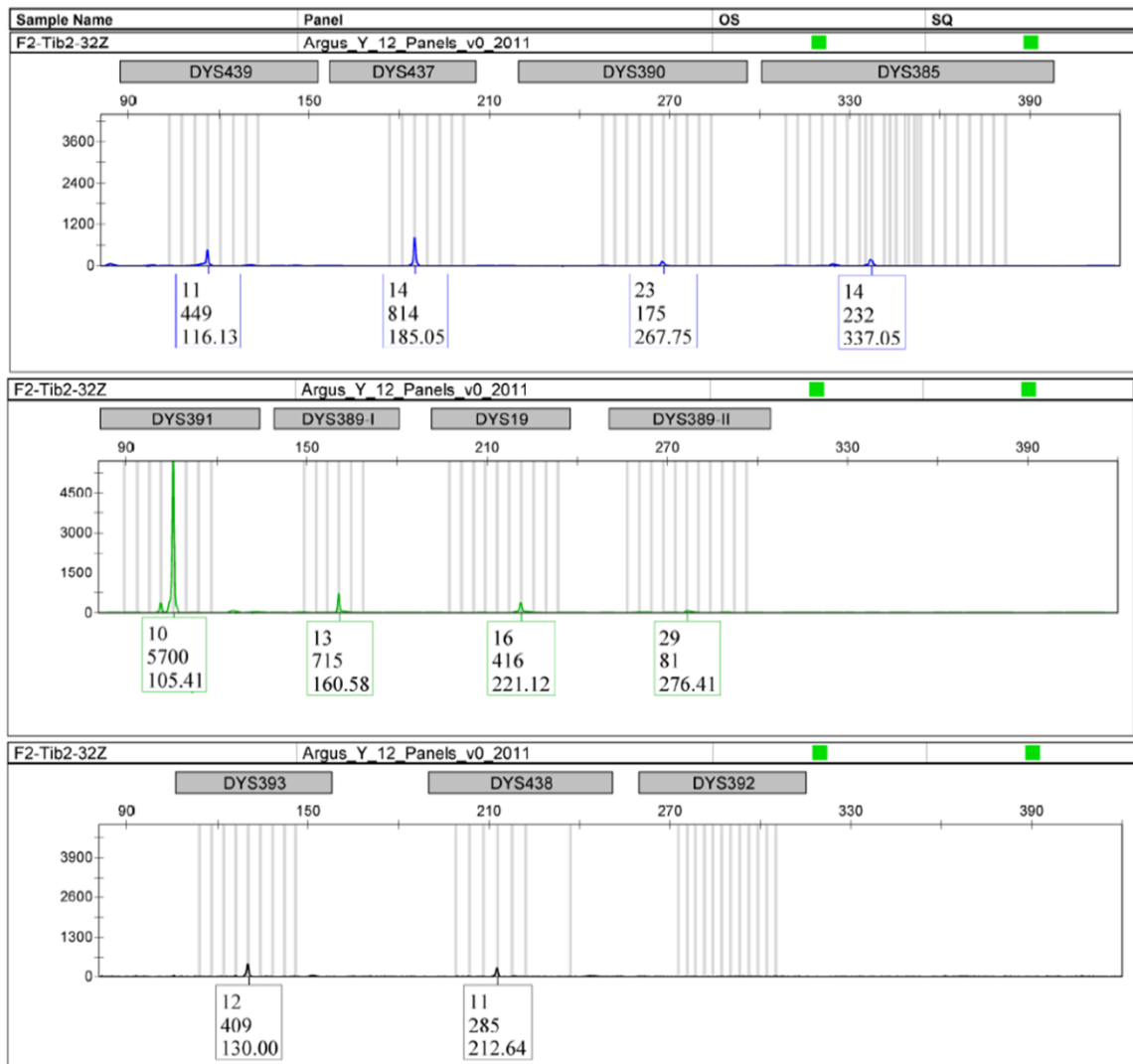


Abbildung 12: Elektropherogramm F2-Tibia dextra.

Die mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff markierten Systeme zeigen den für aDNA typischen Abfall der RFU mit zunehmender Fragmentlänge. Im Allgemeinen überschreitet die Höhe der Peaks nur in einem System (DYS391) 1000 RFU. Die Fragmentlänge beträgt in diesem Fall 105,41 bp. Das Letzte System enthält einen ebenfalls für aDNA und low-level DNA typischen *Allelic-drop-out*.

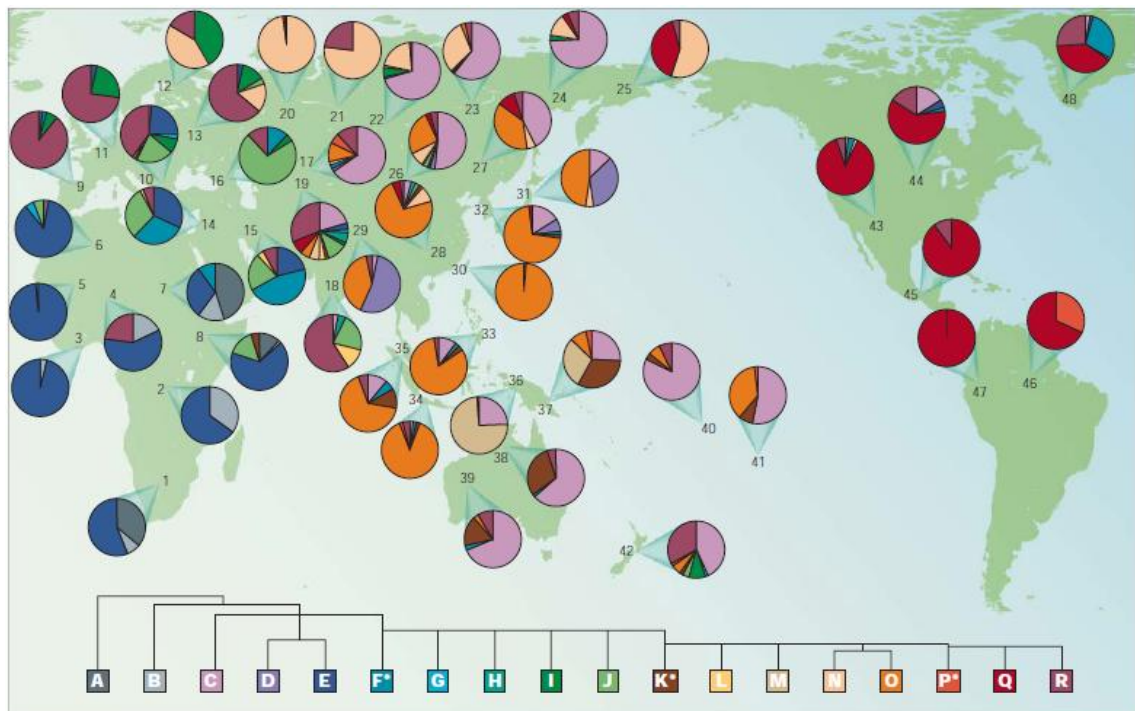
### 5.3 Populationsgenetische Auswertung anhand der verwendeten Datenbanken

Die fünf verschiedenen Haplotypen zeigten in allen Fällen Resultate. Vier der fünf Haplotypen konnten anhand der Ergebnisse und den damit verbunden Angaben der Haplogruppen, diesen zugeordnet werden. Da viele der gespeicherten Daten in der ySearch Datenbank keine Haplogruppe anzeigen, sind diese jedoch nur unter Vorbehalt zugeordnet worden (Tabelle 15). Der Probe F3-4 konnte aufgrund der fehlenden Angabe und des zu geringen Ergebnisumfangs keiner Haplogruppe

zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde sie von der anschließenden AMOVA-Testung ausgeschlossen.

Im Gegensatz zu den Autosomen und X-Chromosomen stammen alle rezenten Y-Chromosomen von einem einzigen Vorläufer ab. Unbekannt ist dabei wann dieser Vorfahre lebte und ob er schon zur Gattung *Homo sapiens sapiens* zählte. Da auch das Y-Chromosom Mutationen frei unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass sich heutige Sequenzvarianten von dem gemeinsamen Vorfahre unterscheiden. Die Besiedelung der Erde hatte die Verteilung des Y-Chromosoms zur Folge. Migrationen und Isolationen führten dazu, dass sich das Y-Chromosom innerhalb der Gruppen nicht mehr austauschen konnte. Mutationen verbreiteten sich nur noch innerhalb dieser Gruppen, wodurch für Populationen typische Haplotypen entstanden und andere wiederum gänzlich verschwanden. Auch gesellschaftliche und reproduktive Einflüsse haben Auswirkungen auf die Diversität des Y-Chromosoms [Roewer, 2000].

Y-STRs können aufgrund ihrer hohen Mutationsraten nur populationsdifferenzierende Prozesse erfassen und messen. Will man die Verteilung des Y-Chromosoms zeitgeschichtlich nachvollziehen, so sind jedoch andere polymorphe Marker wie SNPs einzusetzen. Eine kombinierte Haplotyp-Analyse von Markern (Y-STR und Y-SNP) zeigte erstmals den Zusammenhang zwischen der Verteilung der Y-Chromosomen gemeinsamer Abstammung und dem räumlichen und zeitlichen Verlauf einer demographischen Expansion von Populationen [Roewer, 2000].



**Abbildung 13: Globale Verteilung der Y-Haplogruppen [Jobling, 2003]**

Demografische Verteilung der einzelnen Haplogruppen. Deutlich zu erkennen ist, dass die stammesgeschichtlich älteste Haplogruppe A ausschließlich auf dem afrikanischen Kontinent zu finden ist. Diese Tatsache untermauert die Behauptung, dass in Afrika die Wiege der Menschheit liegt. Die Zahlen geben dabei die einzelnen Populationen an. 1: Kung; 2: Biaka Pygmäen; 3: Bamileke; 4: Fali; 5: Senegalesen; 6: Berber; 7: Äthiopier; 8: Sudanesen; 9: Basken; 10: Griechen; 11: Polen; 12: Saami, 13 : Russen; 14: Libanesen; 15: Iraner, 16: Kazbegi (Georgien) 113; 17: Kasachen, 18: Punjabis; 19: Usbeken, 20, Wald Nentsi; 21, Chanten, 22, Ost Ewenken; 23, Burjaten, 24 , Ewenen, 25, Eskimos, 26, Mongolen, 27, Ewenken, 28, Nord-Han, 29, Tibeter, 30, Taiwanesen, 31, Japanisch, 32, Koreaner, 33, Filipinos, 34, Javaner, 35, Malaysier, 36, West-Neuguineer (Hochland); 37, Papua-Neuguineer (Küste); 38, Australier (Arnhem), 39, Australier (Sandy Desert), 40, Cook-Insulaner, 41, Tahitiens116; 42, Maori, 43, Navajos, 44, Cheyenne, 45, Mixteken, 46, Makiritare; 47, Cayapa; 48, Grönland Inuit.

Durch immer neuere Forschungsergebnisse kommt es zur immer weiteren Aufschlüsselung der Haplogruppen. Auch die demographische Verteilung der einzelnen Haplogruppen verändert sich im Laufe der Zeit. Anhand der Abbildung 13 aus dem Jahr 2003 und den ermittelten Haplotypen aus der ySearch Database wurde eine grobe geografische Zuordnung der Proben durchgeführt. Es lassen sich anhand des häufigen Vorkommens der Haplogruppe R die Proben F1;2-2 und F4-5 den baskischen, griechischen, polnischen oder russischen Populationen zuordnen. Jedoch tritt diese Haplogruppe auch häufig in der Population der Punjabis auf. Der Subtyp R1b ist in 70 % der Männer aus Südengland sowie in Teilen Spanien und in Irland bei 90 % der Männer zu finden [URL-3]. Aufgrund der Ergebnisse der ersten AMOVA, bei der die Haplotypen der Proben als eine Population gewertet wurde, schloss sich eine Aufschlüsselung der Proben anhand ihrer Haplogruppen an. So wurden die Proben F1;2-2 und F4-4, welche zum Haplotyp R1b zählen, zu einer Population zusammengefasst und mit den Populationen der Deutschen, Italiener, Spanier, Portugiesen und Inder verglichen.

Populationen aus England und Irland waren in der Datenbank leider nicht gespeichert und konnten daher nicht zum Vergleich herangezogen werden.

Anhand dieser Ergebnisse konnten keine Aussagen darüber getroffen werden, in wie weit die Haplotypen zu einer der ausgewählten Population zählen. Die Werte für den Differentialindex  $\Phi_{ST}$  lagen für die Testung mit der Haplogruppe R1b über 0,9, was eine Zuordnung zu den Populationen definitiv ausschließt. Die Probe F2-3 erzielte im Vergleich mit den Populationen aus Deutschland, Island, Niederlanden, Russland und Schweden Werte für den Differentialindex von 0,3713 (Deutschland) bis 0,5101 (Niederlande). Dennoch sind diese Werte nicht signifikant ( $p$ -Wert). Ähnliche Ergebnisse zeichneten sich auch bei der Probe F1-1 mit der Haplogruppe I2 ab.

Es lässt sich vermuten, dass eine solche Zuordnung von einzelnen Haplotypen bzw. kleinen Haplotypgruppen zu einer Population nicht bzw. gar nicht möglich ist. Ein anderer Grund für die insignifikanten Ergebnisse könnten immer noch falsch gewählte Populationen sein oder ein nicht Vorhandensein von Daten in der YHRD.

Anhand der über die ySearch ermittelten Haplogruppen und der Haplogruppenverteilung von McDonald 2005 (siehe Anhang) wurden die Haplotypen wie folgt geografisch zugeordnet; Die Proben mit der Haplogruppe R1b lassen vermuten, dass diese Individuen aus Regionen Europas kommen. Vor allem in Westeuropa ist diese Haplogruppe sehr häufig vertreten. Auch die Haplogruppe I findet sich vor allem in europäischen Populationen. Über Internet Recherchen hat sich gezeigt, dass der Subtyp I1 hauptsächlich Nordeuropa einnimmt während sich der Subtyp I2 über Südosteuropa streckt.

Mit Berechnung des Differentialindex  $\Phi_{ST}$  sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit sich die Haplotypen der einzelnen Proben unterscheiden. Da eine Berechnung des Differentialindex  $\Phi_{ST}$  auf der YHRD nur innerhalb der gegebenen Populationen möglich ist, stellt sich in einem nächsten Schritt die bioinformatische Frage, ob es möglich wäre ein Programm zu entwickeln, welches sich auf die Daten YHRD beruft, jedoch zusätzlich eine Berechnung des Differentialindex einzelner Haplotypen zulässt, die frei wählbar sind. Dadurch wird ein individueller Vergleich zwischen zwei Haplotypen ermöglicht.

## **6 Ausblick**

Eine Untermauerung der Hypothese, dass je dicker der Bereich der *Substantia compacta* eines Knochens ist, desto höher ist die DNA-Ausbeute würde sich an die jetzige Arbeit anschließen. Hierfür sollte eine repräsentative Anzahl an Knochenfragmenten aus *cranialen* und *postcranialen* Skelettmaterial verwendet und unter gleichen Voraussetzungen (Menge an Knochenmehl, Dekalzifizierung, DNA-Extraktion) aufbereitet werden. Ein möglicher Vergleich zwischen rezentem und prähistorischem Untersuchungsmaterial könnte dabei mit einbezogen werden.

Zusätzlich zu den bisherigen verwendeten Markern, könnte eine Testung mit dem neu erschienen PowerPlex®Y23 Kit der Firma Promega durchgeführt werden. Dieses Multiplexkit beinhaltet 23 Y-chromosomale STR-Systeme und soll sensitiver sein als das Investigator Argus Y-12. Des Weiteren könnte mit den Haplotypen, die dann aus 23 Systemen bestehen, eine erneute Datenbanksuche nach den Haplogruppen gestartet werden.

Mittels der AMOVA konnte der Differentialindex  $\Phi_{ST}$  zwischen den Populationen bestimmt werden. Leider konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzeugt werden. Aus diesem Grund wäre im Anschluss an diese Arbeit ein Programm zu entwickeln, welches den Differentialindex und dessen Signifikanz zwischen einzelnen Haplotypen berechnet.

## **Literaturverzeichnis**

Appell, H.-J.; Stang-Voss, C. (2008): *Funktionelle Anatomie*. 4. Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg

Brinkmann, B. (2004): *Forensische DNA-Analytik*. Deutsches Ärzteblatt. Vol. 101: A 2329-2334 [Heft 34-35]

Butler, J. M. (2011): *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier

Buselmaier, W.; Tarivedian, G. (2006): *Humangenetik für Biologen*. Springer-Verlag Heidelberg

Dettmeyer, R.; Verhoff, M. (2011): *Rechtsmedizin*. Springer Medizin Verlag Heidelberg

Gey, M. H. (2008): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 2. Auflage: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Herrmann, B.; Saternus, K.-S. (Hrsg.) (2007): *Biologische Spurenkunde Band 1 – Kriminalbiologie*. 1. Auflage: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Jobling, M. A.; Tyler-Smith, C. (2003): *The human Y Chromosome: An evolutionary Marker comes of age*. Nature Reviews | Genetics. Vol. 4: 598-612

Krawczak, M.; Schmidtke, J. (1994): *DNA-Fingerprinting*. 1. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag G mbH Heidelberg

McHugh, D. E.; Edwards, C. J.; Bailey, J. F.; Bancroft, D. R.; Bradley, D. G. (2000): *The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies*. Ancient Biomolecules. Vol. 3

Perry, W.; Bass, W. M.; Riggsby, W. S.; Sirotkin, K. (1988): *The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death*. Forensic Sci. Vol 33. [Nr. 1]

Roewer, L. (2000) *Die Haplotypisierung des Y-Chromosoms – Grundlagen und Anwendungen einer neuen molekulargenetischen Identifizierungsmethode*. S. 65. Berlin, Humboldt-Universität, Medizinische Fakultät, Habilitationsschrift

Rolf, B.; Wiegand, P. (2004) *Analyse biologischer Spuren*. Rechtsmedizin. Vol. 14: 473-484

Schiebler, T; Korf, H.-W. (2005): *Anatomie*. 10. Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg

Tillmann, B. (2010): *Atlas der Anatomie des Menschen*. 2. Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg

URL-1 (30.07.2012) Gilder, J.: *The technical artifacts of forensic STR testing: stutter, pull-up, spikes, blobs and degradation*.

URL: <http://www.bioforensics.com/conference047Artifacts/index.html>

URL-2 (30.07.2012) Seidel, A.: *Prolongations-PCR*.

URL: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/pcr.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/pcr/methoden/methodische\\_varianten/prolongations\\_pcr.vsc.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/pcr.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/pcr/methoden/methodische_varianten/prolongations_pcr.vsc.html)

URL-3 (31.07.2012) Sterk, J.: *Genetische Geschichte: Jürgen Sterk*.

URL: [http://www.ahnenforschung-sterk.de/dateien/pdf/geneografic\\_juergen\\_sterk.pdf](http://www.ahnenforschung-sterk.de/dateien/pdf/geneografic_juergen_sterk.pdf)

URL-4 (31.07.2012) McDonald, J. D.: *World Haplogroups Maps*.

URL:

Wagner, G. W. (Hrsg.) (2007): *Einführung in die Archäometrie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Witt, M. (2007): *Anatomie-GK1*. 1. Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg

# Anhang

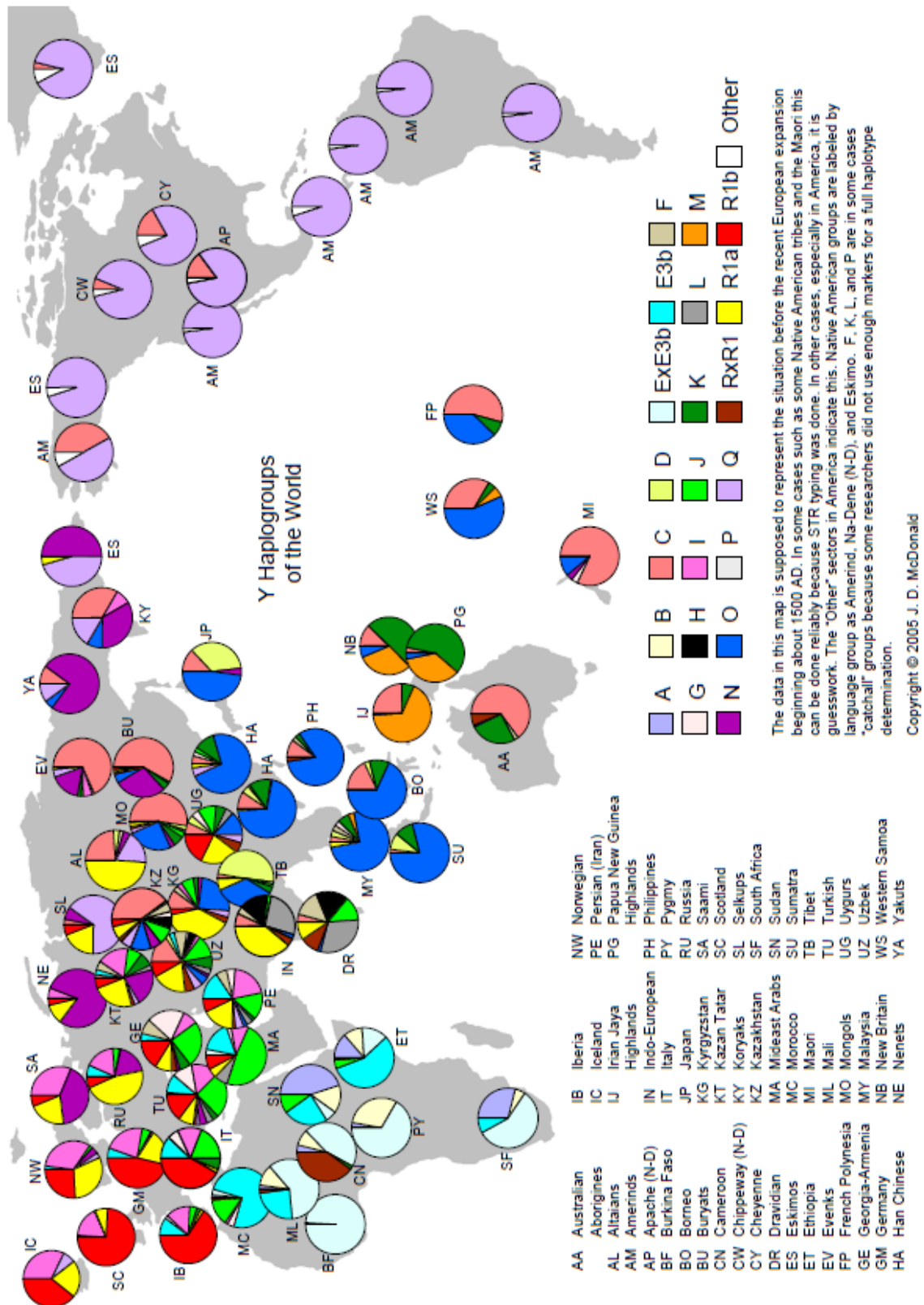


Abbildung Anhang 1: Globale Haplogruppenverteilung nach McDonald 2005 [URL-4]



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 10. August. 2012

---

Maria Harthun